UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
MAR 9 '56

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

F. M. Huennekens: Flavin Nucleotides and Flavoproteins 1
H. Stich: Bau und Funktion der Nukleolen 7

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

H. R. van der Vaart: A Closed Expression for Certain Probabilities in Wilcoxon's two Sample Test 14
G. H. Brown, J. F. Dreyer, H. R. Lubowitz, and W. H. H. Middendorf: Electro-optical Shift 15
H. Röckert: Variations in the Calcification of Cementum and Dentin as Seen by the Use of Microradiographic Technique 16
J. N. Chatterjea: A Synthesis of α-Brazan and the Related Quinone 18
P. H. Kopper: Nucleoside Decomposition by Bacterial Cells 19
C. Schöpf und R. Unger: Über physiologische, durch einen Gehalt an verschiedenen Alkaloiden charakterisierte Rassen von *Sedum acre* L. 19
W. Bösenberg, W. Dittrich, H. Heinrich, R. Hüllemann und U. Lange: Chromosomenaberrationen in Tumorasziteszellen des Ehrlich-Karzinoms der Maus nach Röntgenbestrahlung *in vivo* bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrucken 21
J. Kebrle und K. Hoffmann: Über den biologischen Abbau eines Glutarsäureimids 21
J. A. Luetscher, Jr., R. Neher, and A. Wettstein: Isolation of Crystalline Aldosterone from the Urine of Patients with Congestive Heart Failure 22
A. Bećarević, K. Kaćanski, D. Mančić et Ljiljana Hadžić: Effets de l'irradiation sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs dérivés acidosolubles chez le rat 23
G. Turian: Activation concomitante par l'hétéroauxine de la résorption du corps paranucléaire ribonucléique et de la germination des zygotes chez *Allomyces* 24
C. Pellegrino and A. Torcigliani: Effect of Inanition and Adrenalectomy on the Electrophoretic Patterns of Soluble Lymphatic Tissue Proteins 26
B. M. Bloom, E. J. Agnello, and G. D. Laubach: $C_{(14)}$-Substituted Corticosteroids. Some D Ring Transformations in the Compound S Series 27
B. Schär und R. Meier: Leukozytenemigrationsfördernde Wirkung von Crotonöl 30
M. Bracco, P. C. Curti e V. Giuliano: Identificazione della 5-OH-Triptamina nei trombociti degli ucelli 31
F. Reubi: La préssion intrarénale chez l'homme 33
E. Dodt: Geschwindigkeit der Nervenleitung innerhalb der Netzhaut 34
G. Moruzzi and O. Pompeiano: Crossed Fastigial Atonia 35
H.-J. Hufschmidt: Spielen die Eigenreflexe bei raschen Willkürkontraktionen eine entscheidende Rolle? 36
Ch. Eger: An Attachment for the Measurement of the Absorption Spectra on Paper Chromatograms (Pro Laboratorio) 37
N. C. Ganguli: Use of Large Filter Paper Sheet in Circular Paper Chromatography by Descending Technique (Pro Experimentis) 38

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Sample Survey Methods and Theory. By M. H. Hansen, W. N. Hurwitz, and W. G. Madow (John Wiley & Sons Inc., New York, 1953) (Ref. A. Linder) 39
The Mechanism of Enzyme Action. By W. D. McElroy and B. Glass (The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954) (Ref. K. Riise-Schäferna) 40
The Enzymes. Vol. IV, part 2. Edited by J. B. Sumner and K. Myrbäck (Academic Press Inc., New York, 1952) (Ref. A. J. Businger) 40

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero fr. 46.–. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 ×21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–, ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 ×21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249800; Telegrammadresse: Edita Basel

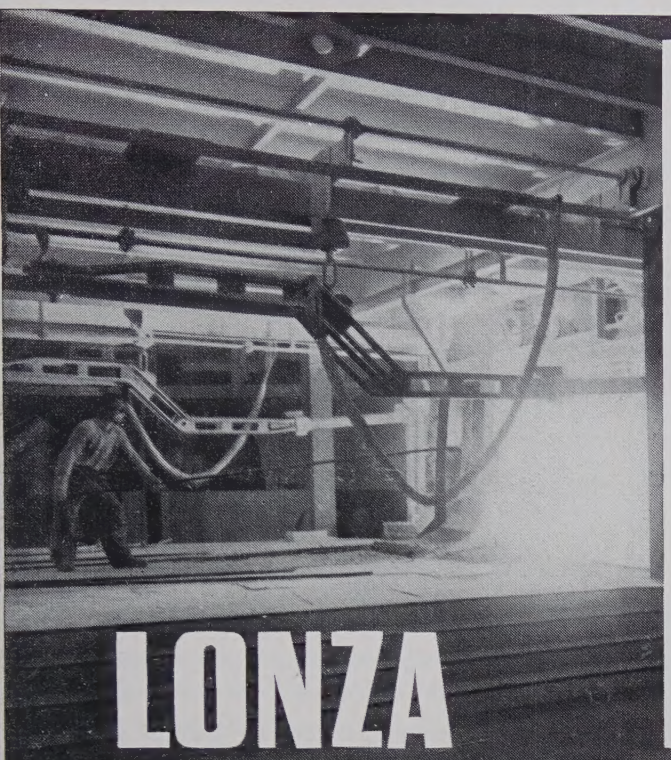
EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.–; other countries fr. 46.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 ×21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG. Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XII/1

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
E. I. Du Pont de Nemours & Co., London
Ganz & Co., Zürich
Lonza AG., Basel
Sandoz AG., Basel
Trüb, Täuber, Zürich
VEB Carl Zeiss, Jena



LONZA

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und Schweisszwecke

Metallegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium, Ferro-Silico-Aluminium, Ferro-Silico-Aluminium-Mangan, Silicium-Calcium-Aluminium, Calcium-silicium

Graphit

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar (Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphat-kali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Dicyandiamid, Guanidinnitrat, Ammoniak, Salpetersäure, Nitriersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harnstoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl, Vinylacetat monomer

Organische Lösungsmittel: Aceton, Aethylacetat, Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate, Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat

Vinylharze: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Mischpolymerisate

ELEKTRIZITÄTSWERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

Required for permanent positions in U.S.A.

in field of plastics & plastic intermediates

ORGANIC, PHYSICAL and POLYMER CHEMISTS with excellent, university training. Should have or soon expect Ph. D. degree or equivalent. Further academic or industrial experience desirable. Age 25 to 30.

Chemists will make physico-chemical studies requiring initiative and imagination.

Salaries commensurate with age and experience and according to USA. scales.

Apply in writing stating qualifications, intention to emigrate and age, to:

E. I. DU PONT DE NEMOURS & CO., *Bush House, Aldwych, London W.C.2, England*

BECKMAN

AUTOMATISCHES
QUARZ - SPEKTROPHOTOMETER

MODELL

DK-1

- Automatisch messend und registrierend
- Spektralbereich: **200–3000 mμ**
- Auflösung:
  0,3 mμ im UV, 1 mμ im Sichtbaren, 3 mμ im IR
- Doppelstrahlprinzip kombiniert mit den Vorteilen des Einstrahlverfahrens
- Empfänger: PbS-Zellen modernster Konstruktion. IP28 Photomultiplier
- Wechselstromnetzanschluss. Eingebaute hochwirksame Stabilisation
- Grosse Schreibgeschwindigkeit:
  UV-Bereich: 2,5 Minuten
  Sichtbarer Bereich: 40 Sekunden
  Naher Infrarot-Bereich: 1,5 Minuten
- Schreiber mit Zeitkonstante 1 Sekunde
- **Lineare** Aufzeichnung umschaltbar für **Transmission** und **Extinktion** oder in relativen Energieeinheiten
- Modell DK-1 hat sich auch in der Schweiz glänzend bewährt
- Flammenzusatz lieferbar, Reflexions-Messzusatz in Vorbereitung

Zuverlässige Beratung und Service
durch eigenes Fachpersonal

GANZ & CO
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 14/E

Neuerscheinungen

Doetsch

Handbuch der Laplace-Transformation

Band II

Anwendungen der Laplace-Transformation, 1. Abteilung

Von Dr. *Gustav Doetsch*, Professor an der Universität Freiburg. 436 Seiten mit 48 Figuren. Preis gebunden Fr. 56.15 (DM 56.15), broschiert Fr. 52.– (DM 52.–). Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften» – Mathematische Reihe, Band 15

INHALT: Asymptotische Entwicklungen – Konvergente Entwicklungen – Gewöhnliche Differentialgleichungen.

Der Band bringt die 1. Abteilung der Anwendungen der Laplace-Transformation in einer Form, die über das rein Stoffliche hinaus einerseits den Mathematiker mit den einschlägigen Problemen der Technik bekannt macht und andererseits dem Ingenieur zeigt, wie er die weittragenden Methoden der Laplace-Transformation für seine Probleme nützen kann.

Haack

Elementare Differentialgeometrie

Von Dr. *Wolfgang Haack*, Professor an der Technischen Hochschule Berlin. 239 Seiten mit 25 Abbildungen. Preis gebunden Fr. 22.– (DM 22.–), broschiert Fr. 18.70 (DM 18.70). Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften» – Mathematische Reihe, Band 20.

INHALT: Vektoren und Bewegungsinvarianten – Kurven im Raum – Einparametrige Dreibeinscharen. Streifen – Elemente der Flächentheorie – Abbildungen zweier Flächen aufeinander – Ableitungsgleichungen und Integrierbarkeitsbedingungen – Geometrie auf der Fläche – Minimalflächen – Zweidimensionale Dreibeinmannigfaltigkeiten – Existenzsätze der Flächentheorie.

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL / STUTTGART

EXPERIENTIA

Vol. XII - Fasc. 1 Pag. 1–40 15. I. 1956

Flavin Nucleotides and Flavoproteins[1]

By F. M. HUENNEKENS[2], Seattle (U. S. A.)

Due to their bright yellow color and powerful yellow-green fluorescence, the flavins were among the earliest substances to be recognized in various tissues as participants in enzymic processes. Following its isolation from various biological tissues[3], the structure of riboflavin[4], or Vitamin B_2 as it later became known, was established unequivocally as 6,7-dimethyl-9-(D-1′-ribityl) isoalloxazine (*a* in Fig. 1) through its total synthesis in 1935 independently by the laboratories of KUHN[5] and KARRER[6]. Evidence was soon produced, however, that the nucleoside, Rb, existed principally as a precursor or a breakdown product of naturally occurring flavin nucleotides. From the highly purified "old yellow enzyme", discovered earlier by WARBURG and CHRISTIAN[7], THEORELL[8] isolated and characterized the prosthetic group as FMN (*b* in Fig. 1). Following this discovery of the first flavin nucleotide, WARBURG and CHRISTIAN in 1938[9], continuing their monumental study of flavins and flavoproteins, isolated and characterized the dinucleotide, FAD (*c* in Fig. 1), and showed its participation as the coenzyme of the D-amino acid oxidase.

Thus, the stage was set with a knowledge of the nucleotide forms of flavin, as well as the vitamin precursor, and the photodegradation products, lumiflavin (6,7,9-trimethyl isoalloxazine) and lumichrome (6,7-dimethyl alloxazine). It was not surprising, therefore, that the ensuing years should witness the isolation and characterization of a variety of flavin-containing enzymes. These past developments have been reviewed comprehensively by THEORELL[10] and by SINGER and KEARNEY[11], and it is the purpose of the present paper to summarize briefly only the more recent extensions in the rapidly expanding field of flavin nucleotides and flavoproteins, particularly those areas with which our laboratory has been concerned.

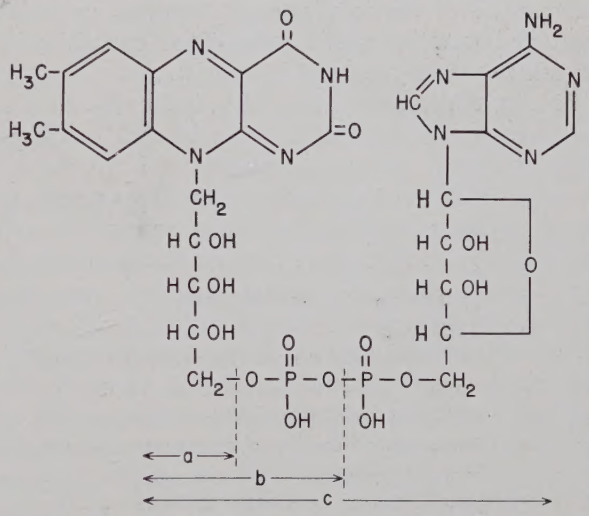


Fig. 1.–Structure of Flavin Nucleotides.

Isolation and Assay of Flavin Nucleotides.–In order to isolate and characterize various flavins, it has been necessary for investigators to devise specific analytical methods for these compounds, which must be sufficiently sensitive to detect a given flavin among large quantities of other nucleotides or other flavins.

The standard microbiological assay for Rb with *L. casei* first introduced by SNELL and STRONG[12] has continued to be the most specific and reliable assay for flavins derived from Rb. Specific enzymatic assays,

[1] The experimental work from this laboratory, referred to in the review, has been supported generously by research grants from Eli Lilly and Co., Initiative 171 of the state of Washington, and by the U.S. Public Health Service. The author would like also to express his appreciation to the following colleagues for their collaboration on various problems in this field: Drs. D. R. SANADI, E. DIMANT, A. SCHEPARTZ, H. R. MAHLER, B. GABRIO, and R. E. BASFORD, and Messrs. S. FELTON and G. KILGOUR.

[2] Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington.

[3] R. KUHN, P. GYÖRGY, and T. WAGNER-JAUREGG, Ber. dtsch. chem Ges. *66*, 317 (1933). – P. ELLINGER and W. KOSCHARA, Ber. dtsch. chem. Ges. *66*, 315 (1933).

[4] The following abbreviations will be used: Rb, riboflavin; FMN, riboflavin-5′-phosphate or flavin mononucleotide; FAD, flavin-adenine-dinucleotide; FAD-X, a cyclic form of FAD; AMP, ADP, and ATP, adenosine mono-, di-, and triphosphates; PP, pyrophosphate; CoA, Coenzyme A.

[5] R. KUHN, K. REINEMUND, H. KALTSCHMITT, R. STRÖBELE, and H. TRISCHMANN, Naturwissenschaften *23*, 260 (1935).

[6] P. KARRER, K. SCHÖPP, and F. BENZ, Helv. chim. Acta *18*, 426 (1935).

[7] O. WARBURG and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. *254*, 438 (1932); *257*, 492 (1933).

[8] H. THEORELL, Biochem. Z. *272*, 155 (1934); *278*, 263 (1935); *290*, 293 (1937).

[9] O. WARBURG and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. *295*, 261 (1938); *296*, 294 (1938); *297*, 417 (1938); *298*, 150 (1938).

[10] H. THEORELL in *Methoden der Fermentforschung*. Vol. III, ed. by E. BAMANN and K. MYRBÄCK, Photo Offset Reproduction (Academic Press, Inc., New York, 1945, pp. 2361–84. – H. THEORELL in *The Enzymes*, Vol. II, Part 1, ed by J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK (Academic Press, Inc., New York, 1951), pp. 335–56.

[11] T. P. SINGER and E. B. KEARNEY in *The Proteins*, Vol. II, Part 2 (in press), ed. by H. NEURATH and K. BAILEY (Academic Press, Inc., New York, 1951).

[12] E. E. SNELL and F. M. STRONG, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. *11*, 346 (1950).

using dissociated flavoproteins, are available for certain of the flavin nucleotides[13]. Thus, FAD and FMN may be assayed accurately in minute quantities ($< 1\ \mu g$) using the apoenzymes of the D-amino acid oxidase[14] or the TPNH-cytochrome *c* reductase[15], respectively.

As with many other nucleotides, the difficulty in obtaining the pure flavins in crystalline form has delayed the establishment of accurate physical constants for these substances. However, the characteristic absorption spectrum (λ_{max} at 260, 375 and 450 mμ) of the flavins has recently taken on new significance as an analytical tool, since WHITBY[16] has provided precise values for the molecular extinction coefficients of pure Rb, FMN and FAD at these wave lengths. The intense yellow-green fluorescence has been used chiefly for the *qualitative* detection of flavins, although BESSEY *et al.*[17] have devised a *quantitative* procedure for the fluorometric estimation of Rb, FMN and FAD. In this connection, WEBER[18] has carried out a definitive study of the quenching effect of various substance supon the fluorescence of the isoalloxazine structure including the very interesting phenomenon of self-quenching by the adenine moiety in FAD (*cf.* also[17]).

Finally, the fluorescence of the flavins also enables extremely small quantities to be located on paper chromatograms. In this laboratory and elsewhere[19] the method of paper chromatography has emerged as one of the most powerful tools for the separation and identification of individual flavins. Furthermore, we have been able to utilize information gained from paper chromatograms to devise systems for the large-scale separation of particular flavins. Thus, a partition column employing phenol-butanol-water with Celite as the supporting medium has been used to separate FAD-X from FAD[20] (see also[16] for the separation of flavins by partition chromatography), while adsorption columns of Celite with phosphate buffer as the developing solvent will effect a separation of Rb, FMN and FAD[21]. It should be added that the separation of the above three classes of flavins may be accomplished also by adsorbing the mixture from a mildly alkaline solution on an ion-exchange resin (IRA-400) and eluting in order with water (Rb), 0·1 N acetic acid-acetate buffer (FMN) and 1·0 N buffer (FAD)[21].

Vitamin Analogues.–Several years ago WHITBY observed that riboflavin, incubated with liver homogenates, gave rise to a new and unidentified flavin, as judged by paper chromatography[22]. Further studies on the purified compound disclosed that it was, in fact, a glucoside of Rb. At present, it is not known whether this novel enzymatic reaction involves a nonspecific formation of a glycoside, with Rb serving conveniently as a chromophoric substrate, or whether the condensation is actually of specific importance in the metabolism of either Rb or glucose.

Almost concurrently with WHITBY's discovery came the announcement by PALLARES and GARZA[23] that lyxoflavin[24] had been isolated from human heart tissue. The identity of the product was tentatively established by comparison with synthetic lyxoflavin prepared by the KUHN-KARRER techniques[25]. Soon thereafter, vitamin activity was ascribed to lyxoflavin on the basis of growth studies with rats[26], chicks[27] and pigs[28]. Despite the convincing nature of these nutritional findings, the natural occurrence of lyxoflavin has been disputed recently by GARDNER *et al.*[29], and by SNELL *et al.*[30], who were unable to detect by a differential microbiological assay any lyxoflavin in the various tissues, including heart, of the rat. Of great interest in SNELL's work, however, was the finding that the organism *L. lactis* is capable of utilizing lyxoflavin for growth without converting it to Rb. Experiments in this laboratory being carried out in collaboration with E. E. SNELL have disclosed that in this organism lyxoflavin is incorporated into a flavin mono- and dinucleotide, which may be abbreviated as LMN and LAD, and that these nucleotides function as flavin coenzymes in the cell. LMN and LAD have been tested for coenzyme activity with the D-amino acid apo-oxidase[14]

[13] F. M. HUENNEKENS and S. FELTON, submitted to *Methods in Enzymology*, Vol. III, ed. by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN (Academic Press, Inc., New York).

[14] H. S. CORRAN, D. E. GREEN, and F. B. STRAUB, Biochem. J. *33*, 793 (1939).

[15] E. HAAS, B. HORECKER, and T. HOGNESS, J. Biol. Chem. *136*, 747 (1940).

[16] L. G. WHITBY, Biochem. J. *54*, 437 (1953); see also Biochem. Biophys. Acta *15*, 148 (1954).

[17] O. BESSEY, O. H. LOWRY, and R. H. LOVE, J. Biol. Chem. *180*, 755 (1949).

[18] G. WEBER, Biochem. J. *47*, 114 (1950).

[19] J. L. CRAMMER, Nature *161*, 349 (1948). – J. P. HUMMEL and O. LINDBERG, J. Biol. Chem. *180*, 1 (1949). – L. G. WHITBY, Nature *166*, 479 (1950); Biochem. J. *50*, 433 (1952). – E. DIMANT, D. R. SANADI, and F. M. HUENNEKENS, J. Am. Chem. Soc. *74*, 5440 (1952). – F. M. HUENNEKENS, D. R. SANADI, E. DIMANT, and A. I. SCHEPARTZ, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 3611 (1953). – H. S. FORREST and A. R. TODD, J. Chem. Soc. *1950*, 3295. – W. FORTER and P. KARRER, Helv. chim. Acta *36*, 1530 (1953).

[20] E. DIMANT, D. R. SANADI, and F. M. HUENNEKENS, J. Am. Chem. Soc. *74*, 5440 (1952).

[21] Unpublished observation of this Laboratory.

[22] L. G. WHITBY, Nature *166*, 479 (1950); Biochem. J. *50*, 433 (1952).

[23] E. S. PALLARES and H. M. GARZA, Arch. Biochem. *22*, 63 (1949).

[24] The analog of Rb, wherein lyxityl, the alcohol form of the rare sugar, lyxose, has replaced the ribityl group.

[25] R. KUHN, K. REINEMUND, H. KALTESCHMITT, R. STRÖBELE, and H. TRISCHMANN, Naturwissenschaften *23*, 260 (1935). – P. KARRER, K. SCHÖPP, and F. BENZ, Helv. chim. Acta *18*, 426 (1935).

[26] G. A. EMERSON and K. FOLKERS, J. Amer. Chem. Soc. *73*, *2398* (1951); *73*, 5383 (1951). – J. M. COOPERMAN, W. L. MARUSICH, J. SCHEINER, L. DREKTER, E. RITTER, and S. H. RUBIN, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *81*, 57 (1952).

[27] J. M. COOPERMAN, W. L. MARUSICH, J. SCHEINER, L. DREKTER, E. RITTER, and S. H. RUBIN, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *81*, 57 (1952). – H. W. BRUINS, M. L. SUNDE, W. W. CRAVENS, and E. E. E. SNELL, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *78*, 535 (1951).

[28] R. C. WAHLSTROM and B. C. JOHNSON, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *79*, 636 (1952).

[29] T. S. GARDNER, E. WENIS, and J. LEE, Arch. Biochem. *34*, 98 (1951).

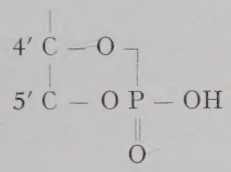
[30] E. E. SNELL, O. A. KLATT, H. W. BRUINS, and W. W. CRAVENS, Proc. Soc. Exp. Biol. and. Med. *82*, 583 (1953).

and TPNH-cytochrome *c* apo-reductase[15], respectively, and it has been found that neither is utilized quite as well (i.e., a larger value of the MICHAELIS constant is obtained) as the riboflavin analogues, FMN and FAD. The remarkable specificity of enzymes is once again demonstrated by this ability to distinguish the subtle difference between riboflavin and lyxoflavin coenzymes. In this connection it will be of interest to ascertain whether typical flavin apo-enzymes isolated from *L. lactis* will use the lyxoflavin coenzymes more preferentially than the Rb counterparts.

Flavin Mononucleotides.–The chemical synthesis of riboflavin-5′-phosphate was reinvestigated recently by FORREST and TODD[31] who found that the classical sequence of KUHN *et al.*[32]:

Rb → 5′-Trityl-Rb → 2′,3′,4′-Acetyl-5′Trityl-Rb → 2′,3′,4′-Acetyl Rb → 2′,3′,4′-Acetyl-5′-Phospho Rb → 5′-Phospho Rb

can be obviated, inasmuch as Rb in dry pyridine could be phosphorylated directly with $POCl_3$ in the presence of a trace of water to initiate the reaction. It is of interest that in this simplified synthesis the primary product is riboflavin-4′,5′(cyclic) phosphate, i.e.,



which can be hydrolyzed subsequently in acid to yield preferentially the 5′-phosphate, FMN. At the same time, FLEXSER and FARKAS[33] at Hoffman-La Roche developed a similar, large-scale technique with substituted phosphoryl chlorides, enabling their company to supply in commercial lots pure FMN (crystallized as the diethanolamine salt or later, as the sodium salt). Another new method for the synthesis of FMN, wherein Rb is heated directly with metaphosphoric acid, has been described by VISCONTINI *et al.*[34].

Paralleling these chemical studies, the enzymatic synthesis of FMN has been established by KEARNEY and ENGLARD[35]. From brewer's yeast they were able to purify an enzyme, *flavokinase*, which catalyzes the following reaction:

$$Rb + ATP \rightarrow Rb\text{-}5\text{-}P + ADP.$$

Other Rb analogues, such as araboflavin and 6,7-dichloroflavin were also converted to their mononucleotide forms by this enzyme[36]. The enzymatic degradation of FMN has not been explored, as yet, in a systematic way, although is has been shown by HEPPEL and HILMOE[37] that FMN is cleaved to Rb very slowly by a specific 5′-nucleotidase from bull semen.

Interest in riboflavin-5′-*pyro*phosphate has developed recently since this compound might serve as a potential intermediate in the total synthesis of FAD, and because it would be an interesting analog of FMN. The chemical synthesis of riboflavin pyrophosphate has been attempted in this laboratory by treating the silver salt of FMN with $POCl_3$ at low temperature in dimethylformamide. Another synthesis of this compound has also been reported by SERCHI and ALBERTAZZI[38] but details of the method are not yet available. The recent method of HALL and KHORANA, wherein uridine monophosphate is treated with H_3PO_4 in the presence of a carbodiimide to give a good yield of the mixed products, uridine di- and triphosphate[39], would appear to offer still another, and perhaps preferable, route to riboflavin pyrophosphate.

Flavin Dinucleotides.–In addition to the classical method of WARBURG and CHRISTIAN[40] for the isolation of FAD, several more recent methods have been developed. For routine laboratory use, FAD of 10–30% purity on a dry weight basis can be isolated almost quantitatively from suitable tissues, such as liver or yeast, by the method of DIMANT *et al.*[20]. Further purification (50–75%) of this material can be achieved by: (a) partition chromatography with phenol-butanol and water as the solvent system[20]; (b) ion-exchange chromatography on IRA-400, as mentioned above[21] or on Dowex-1; or (c) large-scale paper chromatography using t-butanol: water as the solvent system[41]. A commercial preparation of about 60% purity is now available from the Sigma Chemical Co. Another procedure for the isolation of FAD has been devised by WHITBY[16] which makes use of extraction into phenol, partition chromatography with n-butanol: n-propanol: water as the solvent system and crystallization of the final product in pure form from hot water. The obvious advantages of this latter method are offset slightly by the time required for the various steps and the resultant lower yields.

The chemical synthesis of FAD has been achieved by TODD's group[42] through the condensation of the monosilver salt of FMN and 2′,3′-isopropylidine adenosine-5′-benzyl chlorophosphonate, followed by the removal of the protective isopropylidine and benzyl groups.

[31] H. S. FORREST and A. R. TODD, J. Chem. Soc. *1950*, 3295.
[32] R. KUHN, H. RUDY, and F. WEYGAND, Ber. dtsch. chem. Ges. *69*, 1543 (1936).
[33] L. A. FLEXSER and W. G. FARKAS, XII[th] Intern. Congr. pure appl. Chem., New York, Sept. 1951, Abstracts p. 71.
[34] M. VISCONTINI, C. EBNÖTHER, and P. KARRER, Helv. chim. Acta *35*, 457 (1952).
[35] E. B. KEARNEY and S. ENGLARD, J. Biol. Chem. *193*, 821 (1951).
[36] E. B. KEARNEY, J. Biol. Chem. *194*, 747 (1952).
[37] L. A. HEPPEL and R. J. HILMOE, J. Biol. Chem. *188*, 665 (1951)
[38] G. SERCHI and G. ALBERTAZZI, *Chimica* (Milan) *8*, 54 (1953); Chem. Abst. *47*, 9555f (1953).
[39] R. G. HALL and H. G. KHORANA, American Chemical Society Meeting, Kansas City, March 1954, Abstracts p. 23c.
[40] O. WARBURG and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. *298*, 150 (1938).
[41] Private communication from Dr. HENRY R. MAHLER.
[42] S. CHRISTIE, G. W. KENNER, and A. R. TODD, Nature *170*, 924 (1952); J. Chem. Soc. *1954*, 46.

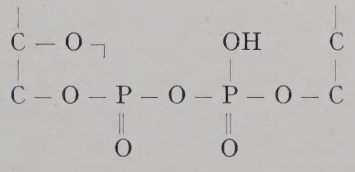
This outstanding achievement not only marks the first total synthesis of any dinucleotide, but also indicates the probable role that chemical synthesis is destined to play in the commercial supply of nucleotides[43].

The mechanism of the biosynthesis of FAD, first recognized by Klein and Kohn[44], has been elucidated by Schrecker and Kornberg[45] who purified an FAD-synthetase from brewer's yeast. This enzyme catalyzes the reaction:

$$FMN + ATP \rightarrow FAD + PP$$

which is seen to be analogous to the enzymatic synthesis of diphospho-pyridine nucleotide or coenzyme A. Todd[46] has called attention to the probable similarity in mechanism between enzymatic and chemical syntheses of FAD. The enzymatic degradation of FAD also has received attention, and it has been shown by Kornberg and Pricer[47] that a general nucleotide pyrophosphatase, isolated from potato, rapidly splits FAD into FMN and AMP.

During the isolation of FAD from various tissues, Dimant *et al.*[20] observed the presence of an unidentified flavin dinucleotide not identical with FAD. This substance, FAD-X, was later characterized as a *cyclic* form of FAD, i.e.,



since upon enzymatic hydrolysis with nucleotide pyrophosphatase, it yielded riboflavin-4′,5′-cyclic-phosphate and AMP[48]. FAD-X has no coenzymatic activity with the D-amino acid apo-oxidase, but it has not yet been tested with other dissociated flavoproteins. It may well be that FAD-X is an artifact resulting from the exposure of FAD to basic solutions during the isolation procedure, since the generation of other cyclic phosphate structures (*e.g.*, adenosine-2′,3′-(cyc.)-phosphate, pantothenic-2,4-(cyc.)-phosphate and glucose-1,2-(cyc.)-phosphate during hydrolysis of ribonucleic acid, coenzyme A and uridine-diphosphate-glucose, respectively) is well-established. On the other hand, the ready susceptibility of phosphorylated compounds to assume a *cyclic* phospho-diester structure under the influence of chemical reagents may suggest the occurrence of a corresponding reaction under enzymic control.

Metallo-flavoproteins.–Of more direct enzymic significance has been the discovery of "anomalous" flavins as prosthetic groups of the DPN-cytochrome *c* reductase[49] and the butyryl-CoA dehydrogenase[50]. In the former case, the highly purified enzyme contained a flavin dinucleotide, which was much more labile than either FAD or FAD-X, so that after detachment from the enzyme it is always recovered largely in its mononucleotide and vitamin forms, with only a small amount of dinucleotide remaining. The labile dinucleotide form has no activity in the D-amino acid oxidase system. Upon examining the reductase flavin by paper chromatography, it was surprising to observe that in basic solvent systems, the material exhibited only a "quenching" type spot under ultra-violet light instead of the customary yellow-green fluorescence shown by all other flavins and by this flavin in all other systems[21]. It is of interest moreover, that this "quenching" spot reacts with an aniline trichloracetate spray, indicative of free sugars or easily split glycosides. Some clarification of this problem has been provided by the recent finding[51] that 4 molecules of iron and 1 molecule of flavin are attached to a molecule of enzyme. It is possible that a metalloflavin complex would account for the above "anomalous" properties, or it may be that in addition to the metal, the reductase flavin does possess some novel structural feature.

Interest in the above problem has been stimulated further by our recent observation that the crystalline flavoprotein isolated several years ago by Kunitz and McDonald[52] from baker's yeast, appears to contain the same flavin as the reductase[21]. However, this crystalline flavoprotein, whose catalytic function is still unknown, is definitely not a DPNH or TPNH cytochrome *c* reductase or diaphorase[21] and has, in addition, a second prosthetic group, whose properties have been described by Ball[53].

The butyryl-CoA dehydrogenase isolated in homogeneous form by Green and his colleagues[54] as one of a series of enzymes catalyzing the sequence of fatty acid oxidation is likewise an "anomalous" flavoprotein of emerald green color. In this case, the enzyme is also a metallo-flavoprotein with copper as the other prosthetic group[50]. The flavin moiety appears to be identical with FAD, since it responds quantitatively as FAD in the D-amino acid apo-oxidase test system.

[43] The chemical synthesis of FAD has been accomplished also by the direct condensation of FMN and AMP using di-p-tolyl carbodiimide as the catalyst [G. L. Kilgour and F. M. Huennekens, Fed. Proc. *14*, 236 (1955)].

[44] J. R. Klein and H. I. Kohn, J. Biol. Chem. *136*, 177 (1940).

[45] A. Schrecker and A. Kornberg, J. Biol. Chem. *182*, 795 (1950).

[46] A. R. Todd, Harvey Lectures, New York, 1951.

[47] A. Kornberg and W. E. Pricer, J. Biol. Chem. *182*, 763 (1950).

[48] F. M. Huennekens, D. R. Sanadi, E. Dimant, and A. I. Schepartz, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 3611 (1953).

[49] H. R. Mahler, N. K. Sarkar, L. P. Vernon, and R. A. Alberty, J. Biol. Chem. *199*, 585 (1952).

[50] H. R. Mahler, J. Biol. Chem. *206*, 13 (1954).

[51] H. R. Mahler and D. G. Elowe, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 5769 (1953).

[52] M. Kunitz and M. R. McDonald, J. Gen. Physiol. *29*, 393 (1946).

[53] E. Ball, J. Gen. Physiol. *29*, 413 (1946).

[54] D. E. Green, S. Mii, H. R. Mahler, and R. M. Bock, J. Biol. Chem. *206*, 1 (1954).

Enzyme	Source	Prosthetic groups		Reference
		Flavin	Other	
Old yellow enzyme	yeast	FMN	–	1
New yellow enzyme	yeast	FAD	–	2
Diaphorase	pig heart	FAD	–	3
Yeast flavoprotein (TPNH oxidase)	brewer's yeast	FAD	400*	4 5 6
Crystalline flavoprotein	yeast	FR**	360	7 8 5
DPNH cytochrome *c* reductase	pig heart	FR	Fe^{+++}	9 10
DPNH cytochrome *c* reductase	*E. coli*	FAD	–	11
DPNH Perox dase	*S. faecalis*	FAD	–	12
DPNH Menadione reductase	*S. faecalis*	FMN, FAD	–	13
DPNH-Nitrite reductase	*Neurospora Crassa*	FAD	–	14
DPNH, TPNH-Nitrite reductase	soy bean leaves	FAD, FMN	Mn^{++}	14
TPNH cytochrome *c* reductase	pig liver	FAD, FMN	–	15
TPNH cytochrome *c* reductase	beer yeast	FMN	–	16
TPNH-Nitrate reductase	*Neurospora Crassa*	FAD	Molybdenum	17
TPNH-Hydroxylamine reductase	*Neurospora Crassa*	FAD	–	18
Xanthine oxidase	milk	FAD	Molybdenum, 410	19 20 21
Aldehyde oxidase	pig liver	FAD	Molybdenum, Iron protoporphyrin	22 23 24
D-Amino acid oxidase	sheep kidney	FAD	–	25
L-Amino acid oxidase	snake venom	FAD	–	26
L-Amino acid oxidase	rat kidney	FMN	410	27 28
L-Amino acid oxidase	*Neurospora Crassa*	FAD	–	29
Glycine, D-Serine oxidase	pig kidney	FAD	410	30 5
D-Aspartic acid oxidase	rabbit kidney and liver	FAD	–	31
L-α-hydroxy acid oxidase	hog kidney	FMN	–	32
L-Lactic oxidase	*Mycobacterium phlei*	FAD	–	33
Glycollic acid oxidase	spinach	FMN	–	34
Glycollic acid oxidase	rat liver	FAD, FMN	–	35
Lactic oxidase	baker's yeast	FMN	cyt. b_2	36
Diamine oxidase	pig kidney	FAD	–	37
4-Amino azobenzene reductase	rat liver	FAD	–	38
Acyl CoA dehydrogenase (green)	beef liver	FAD	Cu^{++}	39
Acyl CoA dehydrogenase (yellow)	beef liver	FAD	Fe^{+++}	40
Acyl CoA dehydrogenase-cytochrome *c* reductase	beef liver	FAD	–	41
Fumaric hydrogenase	yeast	FAD	–	42
Glucose dehydrogenase	*P. Notatum*	FAD	–	43
Hydrogenase	*Clostridium pasteurianum*	FAD	Molybdenum	44 45

* Indicates absorption maximum of other group.

** Reductase flavin.

[1] O. WARBURG and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. *266*, 377 (1933).
[2] E. HASS, Biochem. Z. *298*, 378 (1938).
[3] H. S. CORRAN, D. E. GREEN, and F. B. STRAUB, Biochem. J. *33*, (1939).
[4] D. E. GREEN, W. E. KNOX, and P. K. STUMPF, J. Biol. Chem. *138*, 775 (1941).
[5] Unpublished observation of this Laboratory.
[6] D. E. GREEN (private communication).
[7] M. KUNITZ and M. R. MCDONALD, J. Gen. Physiol. *29*, 393 (1946).
[8] E. BALL, J. Gen. Physiol. *29*, 413 (1946).
[9] H. R. MAHLER, N. K. SARKAR, L. P. VERNON, and R. A. ALBERTY, J. Biol. Chem. *199*, 585 (1952).
[10] H. R. MAHLER and D. G. ELOWE, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 5769 (1953).
[11] A. F. BRODIE and J. F. GOTS, Fed. Proc. *11*, 191 (1952); see also J. Biol. Chem. *199*, 835 (1952).
[12] M. I. DOLIN, Arch. Biochem. Biophys. *46*, 483 (1953).
[13] M. I. DOLIN, Biochim. Biophys. Acta *15*, 153 (1954).
[14] A. NASON, R. G. ABRAHAM, and B. C. AVERBACH, Biochim. Biophys. Acta *15*, 159 (1954).
[15] B. L. HORECKER, J. Biol. Chem. *183*, 593 (1950).
[16] E. HAAS, B. HORECKER, and T. HOGNESS, J. Biol. Chem. *136*, 747 (1940).
[17] D. J. D. NICHOLAS, A. NASON, and W. D. MCELROY, Nature *172*, 34 (1953). – A. NASON and H. J. EVANS, J. Biol. Chem. *202*, 655 (1953).
[18] M. ZUCKER and A. NASON, Fed. Proc. *13*, 328 (1954).
[19] B. MACKLER, H. R. MAHLER, and D. E. GREEN, J. Biol. Chem. *210*, 149 (1954).
[20] E. G. BALL, J. Biol. Chem. *128*, 51 (1939).
[21] H. S. CORRAN, J. G. DEWAN, A. H. GORDON, and D. E. GREEN, Biochem. J. *33*, 1694 (1939).
[22] H. R. MAHLER, B. MACKLER, D. E. GREEN, and R. M. BOCK, J. Biol. Chem. *210*, 465 (1954).
[23] A. H. GORDON, D. E. GREEN, and V. SUBRAHMANYAN, Biochem. J. *34*, 764 (1940).
[24] W. E. KNOX, J. Biol. Chem. *163*, 699 (1946).
[25] E. NEGELEIN and H. BRÖMEL, Biochem. Z. *300*, 225 (1939).
[26] T. P. SINGER and E. B. KEARNEY, Arch. Biochem. *27*, 348 (1950).
[27] M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO, and S. RATNER, J. Biol. Chem. *161*, 583 (1945).
[28] M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO, and S. RATNER, J. Biol. Chem. *155*, 421 (1940).
[29] K. BURTON, Biochem. J. *50*, 258 (1951).
[30] S. RATNER, V. NOCITO, and D. E. GREEN, J. Biol. Chem. *152*, 119 (1944).
[31] J. L. STILL and E. SPERLING, J. Biol. Chem. *182*, 585 (1950).
[32] C. C. BAKER, Arch. Biochem. *41*, 325 (1952).
[33] N. L. EDSON, Biochem. J. *41*, 145 (1947); see however, W. B. SUTTON, J. Biol. Chem. *210*, 309 (1954).
[34] I. ZELITCH and S. OCHOA, J. Biol. Chem. *201*, 707 (1953).
[35] E. KUN, J. M. DECHARY, and H. C. PITOT, J. Biol. Chem. *210*, 269 (1954).
[36] C. A. APPLEBY and R. K. MORTON, Nature *173*, 749 (1954).
[37] R. KAPELLER-ADLER, Biochem. J. *44*, 70 (1949).
[38] G. C. MUELLER and J. A. MILLER, J. Biol. Chem. *185*, 145 (1950).
[39] H. R. MAHLER, J. Biol. Chem. *206*, 13 (1954).
[40] H. BEINERT and F. L. CRANE, Fed. Proc. *13*, 181 (1954).
[41] F. L. CRANE and H. BEINERT, J. Am. Chem. Soc. *76*, 4491 (1954).
[42] F. G. FISCHER, A. ROEDIG, and K. RAUCH, Ann. Chem. *552*, 203 (1942); see also F. G. FISCHER *et al.*, Naturwissenschaften *27*, 197 (1939); Ann. Chem. *530*, 99 (1937).
[43] C. E. COULTHARD, R. MICHAELIS, W. F. SHORT, G. SYKES, G. E. H. SHRINSHIRE, A. F. B. STANDFAST, J. H. BIRKINSHAW, and H. RAISTRICK, Nature *150*, 634 (1952); Biochem. J. *39*, 24 (1945).
[44] A. L. SHUG, P. W. WILSON, D. E. GREEN, and H. R. MAHLER, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 3355 (1954).
[45] H. R. MAHLER and D. E. GREEN, Science *120*, 7 (1954)

In basic solvents, however, it gives rise to the same "quenching" spot as the reductase flavin[21].

Only brief mention will be made to the general subject of metallo-flavoproteins, since this has been reviewed in detail by MAHLER and GREEN[55]. It has been found by these investigators, and in other laboratories, that a number of flavoproteins have their electron transport scheme linked to cytochrome *c* through a metal ion, *viz.*,

$$\text{substrate} \rightarrow \text{flavin} \rightarrow \text{metal} \rightarrow \text{cytochrome } c.$$
$$\downarrow$$
$$\text{dye}$$

If the metal ion is lost during purification, then oxidation of the substrate can be coupled only with the reduction of a dye such as methylene blue or 2,6-dichlorophenol indophenol (*i.e.*, a "diaphorase" type of reaction), but not with the reduction of cytochrome *c*. At present the known metallo-flavoproteins include: (a) Xanthine oxidase[56], (b) aldehyde oxidase[57], (c) DPNH nitrate reductase[58], (d) hydrogenase[59], (e) DPNH cytochrome *c* reductase[51], (f) acyl CoA dehydrogenase (yellow enzyme)[60], and (g) acyl CoA dehydrogenase (green enzyme)[50]. Enzymes *a* through *d* contain molybdenum, *e* and *f* contain iron, while *g* contains copper.

Pseudo-flavins.–Mention should be made of a recently discovered substance, some of whose properties, and participation in processes usually mediated by flavins, give it the appearance of a "pseudo-flavin". This material, which can serve as a carrier for the oxidation of DPNH by O_2 catalyzed by a pig heart DPNH oxidase[61], is yellow-brown (λ_{max} at 400 mμ) with a weak yellow fluorescence. It is soluble in water but can be extracted into n-butanol. From a preliminary study its properties resemble somewhat those of toxoflavin, isolated many years ago by VAN VEEN and MERTENS[62] from cultures of *Pseudomonas cocovenen* (*Bacterium bongkrek*), and those of the pigment attached to the lactic oxidase isolated from *Mycobacterium smegmatis* by EDSON and COUSINS[63].

Flavoproteins.–The steady growth in knowledge of the chemical and physical properties of the flavins, and the appearance of new flavins, have been paralleled by an increase in the number of established flavoprotein enzymes and a knowledge of the mechanisms by which flavins exert their coenzyme action. The Table is a summary of the known flavoproteins indicating the nature of the flavin, and other, prosthetic groups. With the continued and widespread interest in this area of enzymology, one may look forward with assurance to the continuous expansion of this Table.

Zusammenfassung

Der vorliegende Überblick ist eine kurze Zusammenfassung der gegenwärtigen Entwicklung auf dem Gebiete der Flavinnukleotide und der Flavoproteine.

Beschrieben werden verbesserte chromatographische Methoden (Ionenaustausch, Spaltung und Adsorption) für die Isolierung von Flavinnukleotiden. Diese Substanzen können durch spezifische mikrobiologische und enzymatische Untersuchungen, Absorptions- und Fluoreszenzspektra und Papierchromatographie identifiziert und voneinander unterschieden werden.

Drei Klassen von Flavinen werden im Hinblick auf verschiedene Eigenschaften einschliesslich chemischer und enzymatischer Synthese und enzymatischen Abbaus besprochen: a) Vitamin-Analoga (Riboflavin, Riboflavinylglukosid und Lyxoflavin); b) Flavinmononukleotide (Riboflavin-5′-Phosphat, Riboflavin-4′-5′-Phosphat [Ringform] und Riboflavin-5′-Pyrophosphat); c) Flavindinukleotide (Flavin-Adenin-Dinukleotid und ein zyklisches Analogon). Ausserdem werden Metallo-Flavine und ein neuerdings entdeckter Elektronenträger, genannt Pseudoflavin, behandelt.

Die bekannten Flavoproteine sind in einer Tabelle in bezug auf die katalysierte Reaktion zusammengefasst. Für jedes Enzym werden das Flavin und andere prosthetische Gruppen angegeben.

[55] H. R. MAHLER and D. E. GREEN, Science *120*, 7 (1954).
[56] B. MACKLER, H. R. MAHLER, and D. E. GREEN, J. Biol. Chem. *210*, 149 (1954).
[57] H. R. MAHLER, B. MACKLER, D. E. GREEN, and R. M. BOCK, J. Biol. Chem. *210*, 465 (1954).
[58] D. J. D. NICHOLAS, A. NASON, and W. D. MCELROY, Nature *172*, 34 (1953). – A. NASON and H. J. EVANS, J. Biol. Chem. *202*, 655 (1953).
[59] A. L. SHUG, P. W. WILSON, D. E. GREEN, and H. R. MAHLER, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 3355 (1954).
[60] H. BEINERT and F. L. CRANE, Fed. Proc. *13*, 181 (1954).
[61] F. M. HUENNEKENS, R. E. BASFORD, Fed. Proc. *13*, 232 (1954); J. Biol. Chem. *213*, 951 (1955).
[62] A. VAN VEEN and W. MERTENS, cited in *Biological Oxidations* by C. OPPENHEIMER and K. STERN (Interscience Publishers, New York, 1939), pp. 233–237.
[63] N. EDSON and F. COUSINS, Nature *171*, 702 (1953).

Bau und Funktion der Nukleolen

Von H. Stich, Wilhelmshaven[1]

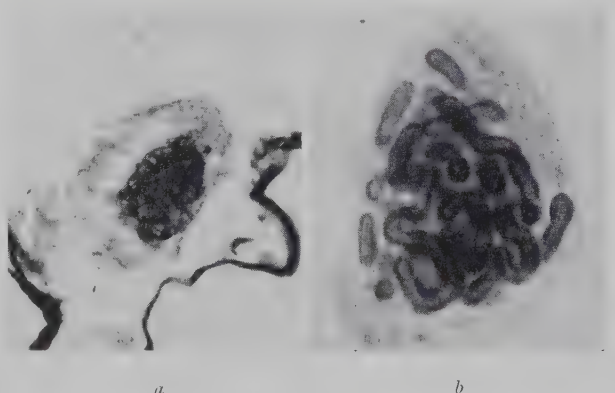
I. *Definition*

Nukleolen sind extrachromosomale, mikroskopisch sichtbare, in den Kernen fast aller pflanzlichen und tierischen Zellen vorkommende, eiweisshaltige Körperchen. Gegenüber dem Kernsaft sind sie durch den kompakteren, gelartigen Aufbau ausgezeichnet. Von den Chromosomen können sie durch das Fehlen von Desoxyribonukleinsäure und dem Reichtum an Ribonukleinsäure unterschieden werden, sowie durch ihr Verhalten während der Mitose. In der Prophase, in der die Chromosomen durch ihre Spiralisation deutlich hervortreten, lösen sich die Nukleolen meist vollkommen auf, fehlen die Ana- und frühe Telophase hindurch und entstehen erst wieder neu im Kern der Telophase und Interphase.

Da das Hauptinteresse der zytologischen Forschung, bedingt durch die weitreichenden Ergebnisse der Genetik, sich auf die Untersuchungen der Chromosomen richtete, blieb unsere Kenntnis über die Nukleolen sehr mangelhaft. Wohl finden sich öfters Angaben über Zahl und Form der Nukleolen, eine ausführliche Analyse steht jedoch bis jetzt noch aus. Deshalb erscheint es auch nicht verwunderlich, dass über ihre Bedeutung keine einheitliche Vorstellung herrscht. Einige der sich meist widersprechenden Hypothesen mögen hierfür einen Eindruck geben: der Nukleolus sollte ein nutzloses Endprodukt des Kernstoffwechsels sein[2], für die Bildung der Chromosomen dienen[3], eine Sekretfunktion besitzen[4], als Fermentspeicher funktionieren[5], in das Plasma übertreten und dort die Bildung verschiedenster Gebilde induzieren[6], eine Melaninproduktion veranlassen[7], die Desoxyribonukleinsäure der Chromosomen liefern[8], seinen Inhalt in das Zytoplasma entleeren[9], die vom Heterochromatin gebildeten Eiweisse sammeln und an das Zytoplasma abgeben[10], und schliesslich der Sitz einer Ribonukleinsäuresynthese sein[11]. Es erscheint deshalb erwünscht, eine kritische Sichtung der Befunde vorzunehmen, die Bedeutung des Nukleolus zu ermitteln und sie mit der Kernfunktion in Beziehung setzen.

II. *Aufbau und Zusammensetzung der Nukleolen*

Zahl, Verteilung und Form der Nukleolen unterliegen grossen Variationen. Sie können art- oder organspezifisch sein, oder schliesslich nur den Ausdruck der augenblicklichen Zelltätigkeit darstellen. In den meisten Fällen gelangen alle drei Faktoren zur Wirkung. Die Artspezifität kann an Zellen mit gleicher Funktion demonstriert werden. So liegt zum Beispiel in den Oozytenkernen der Meduse *Eutimium*, bei vielen Hirudineen und Crustaceen nur jeweils ein Nukleolus vor, bei Tritonen hingegen mehrere hundert und über tausend bei verschiedenen Foraminiferen und Myriapoden. Ein demonstratives Beispiel für eine artspezifische Nukleolenform sind die verschiedenen nahverwandten einkernigen Acetabularien[12] (Abb. 1). Über die Artspezifität lagert sich oft eine Organspezifität, wie aus einem Vergleich der Nukleolen einer Oozyte und einer Drüsenzelle bei *Polyphemus* (Cladocere) leicht ersichtlich ist (Abb. 2). Schliesslich sei noch an Acetabularien als Beispiel die Abhängigkeit der Nukleolenform und



a *b*

Abb. 1. Kerne von *a Acetabularia Wettsteinii* und *b) Acetabularia mediterranea*. Anthrazenblaufärbung.

[1] Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling, Wilhelmshaven.

[2] V. Haecker, Arch. mikr. Anat. *42* (1893).

[3] E. Robertis, W. Nowinski, und F. Saez, General Cytology (Saunders Comp. London, 1954).

[4] K. Konopka und H. Ziegenspeck, Protoplasma *7*, 62 (1929).

[5] Ch. Postelmann und H. Ziegenspeck, Protoplasma *11*, 298 (1930).

[6] B. Wilson, *The Cell in Development and Heredity* (New York, 1925).

[7] T. Goda, Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sect. 4, *2*, 178 (1951).

[8] L. Sharp, *Einführung in die Zytologie* (Borntraeger, Berlin 1931).

[9] H. Altmann, Z. Naturf. *4b*, 138 (1949).

[10] T. Caspersson, *Cell Growth and Function* (Norton, New York 1950).

[11] A. Pollister und C. Leuchtenberger, Nature *163*, 360 (1949). – H. Stich und J. Hämmerling, Z. Naturf. *8b*, 329 (1953).

[12] J. Hämmerling, Arch. Protistenk. *97*, 7 (1944).

des Nukleolenaufbaues vom Energiezustand der Zelle demonstriert (Abb. 6).

a *b* *c*

Abb. 2. Kerne einer *a* Oozyte und *b*, *c* von Drüsenzellen von *Polyphemus pediculus*. Toluidinblaufärbung.

Die meisten Nukleolen besitzen einen heterogenen Aufbau. Sie bestehen aus einer kompakteren, Ribonukleinsäure und Eiweisse führenden Schicht, die Bläschen flüssigen Inhaltes einschliesst. Diese Nukleoleneinschlüsse, die an einigen günstigen Objekten wie zum Beispiel *Corydalis*, *Mesembryanthemum*[13] und *Acetabularia*[14] im Leben beobachtet werden können, bewegen sich ständig innerhalb des Nukleolus, fliessen zu grösseren Einheiten zusammen und werden in den Kernsaft entleert, wobei die Nukleolusoberfläche amöboide Bewegungen ausführt. Grösse und Zahl der Nukleolusbläschen ändern sich während der Entwicklung einer Zelle. Mit dem Wachstum des Nukleolus nehmen sie zu, meist jedoch stärker als der restliche Nukleolusanteil: zum Beispiel betragen die Einschlüsse in den Nukleolen junger Oozyten bei *Diaptomus castor* (Copepode) nur rund 15% des Nukleolusvolumens, in ausgewachsenen Oozyten hingegen rund 75%. Eine Vorstellung über die Bedeutung dieser zweifellos wichtigen Erscheinung steht zur Zeit noch aus. Sie sind irgendwie mit der Nukleolustätigkeit korreliert. In den Nukleolen von stark wachsenden Acetabularien sind die Bläschen weniger stark entwickelt (um 50% des Nukleolusvolumens) als in Zellen mit gehemmtem Stoffwechsel und keinem Wachstum, in denen sich Kern und Nukleolus verkleinern (bis 90%).

Eine Reihe von Untersuchern nimmt eine direkte Entleerung der Nukleoleneinschlüsse in das Zytoplasma an[9]. Die Nukleolusoberfläche soll sich hierbei mit der Kernmembran verbinden, eine Erscheinung, die durch verschiedene Kontraktionszustände des Heterochromatins angeblich verursacht wird. Darauf entsteht ein Porus, durch den der Blaseninhalt in das Zytoplasma ausfliesst[15]. Da die Untersuchungen ausschliesslich an fixiertem Material ausgeführt wurden, konnte bisher der Einwand einer Artefaktbildung nicht ausgeschaltet werden. Bei *Acetabularia* und *Mesembryanthemum* findet mit Sicherheit diese Form der Blasenentleerung nicht statt.

Auch der bei normaler zytologischer Technik im Lichtmikroskop homogen erscheinende Nukleolusanteil besitzt offenbar eine komplexe Struktur. Bei der Vergrösserung im Elektronenmikroskop löst er sich, wie Abbildung 3 deutlich erkennen lässt, in einen Knäuel fädiger Elemente auf, deren Dicke zum Beispiel bei der Menschenleber von 90 bis 180 μ variiert[16]. Eine Innenstruktur lässt sich auch durch Anwendung besonderer Methoden sichtbar machen. So kann bei einigen Objekten nach einer Silber-Gold-Imprägnation nach Cajal im Lichtmikroskop eine fädige Struktur erkannt werden[17]. Eine Identifizierung beider Arten von Nukleolenfäden darf nicht erfolgen, da Strukturen aus zwei verschiedenen Grössendimensionen vorliegen. Auch müssen weitere Untersuchungen abgewartet werden, bevor die Realität dieser Nukleolonemen als gesicherte Gebilde angesehen werden können.

Betrachtet man die grosse Mannigfaltigkeit der Nukleolusformen und des Nukleolusaufbaues, so stellt sich unwillkürlich die Frage, ob denn alle extrachromosomalen Körper in den Zellkernen miteinander vergleichbar sind und unter den Begriff Nukleolus bzw. Nukleolarsubstanz zusammengefasst werden können, oder ob es sich um Gebilde verschiedener Art und Funktion handelt. Es lag nahe, in einer Analyse der stofflichen Zusammensetzung dieser extrachromosomalen Körper eine Auskunft zu suchen.

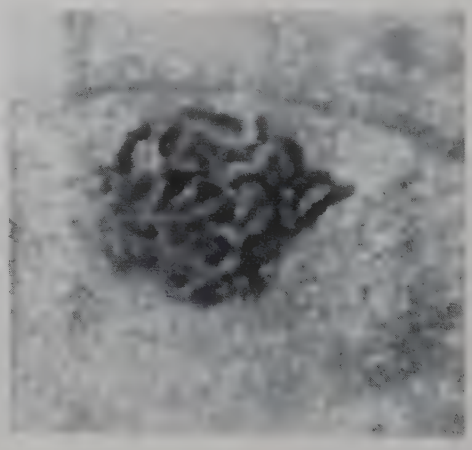


Abb. 3. Elektromikroskopische Aufnahme eines Nukleolus aus der Leberzelle einer Ratte. 21000fache Vergrösserung (nach Bernhard *et al. 1952*).

Die Hauptmasse der Nukleolen besteht aus verschiedenen Eiweisskörpern: aus Phosphorproteiden[18], einfachen basischen Eiweissen und höheren Eiweissen vom Globulintyp. Über die Art der basischen Eiweisse besteht keine einheitliche Auffassung. Manche Forscher halten sie wegen ihres hohen Gehaltes an Diaminosäuren für ein Histon[10], andere hingegen für ein Protamin[19]. Begründet wird die zweite Auffassung durch besondere Lösungsverhältnisse dieser Eiweiss-

[13] E. Küster, *Die Pflanzenzelle* (Fischer, Jena 1951).
[14] H. Stich, Z. Naturf. *6b*, 319 (1951).
[15] H. Altmann, Naturwissenschaften *6*, 138 (1952).
[16] W. Bernhard, F. Haguenau, A. Gautier und Ch. Oberling, Z. Zellf. *37*, 281 (1952).
[17] C. Estable und J. Sotelo, Stain Techn. *27*, 307 (1952).
[18] M. Gersch, Z. Zellf. *30*, 483 (1940).
[19] S. Vincent, Proc. Nat. Acad. Sci. *38*, 139 (1952).

fraktion sowie ihre mengenmässige Zusammensetzung aus Glutaminsäure, Prolin, Arginin, Lysin, Histidin und Phenylalanin, die von derjenigen von Histonen erheblich abweicht. Mit einer bestimmten Eiweissfraktion sind Lipoide verbunden, die besonders an der Nukleolusoberfläche und in den Nukleoleneinschlüssen konzentriert erscheinen[20]. Ein im Verhältnis zu den Proteinen kleiner, aber stets auffindbarer Betrag wird von den Nukleinsäuren eingenommen und zwar von der Ribonukleinsäure. Nur ausnahmsweise, oft nur in ganz bestimmten Entwicklungsphasen gibt der Nukleolus eine positive Feulgenreaktion[21], woraus auf die Anwesenheit einer Desoxyribonukleinsäure geschlossen wird. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass in diesen Fällen die DNS. von den Chromosomen abgestossen und an der Nukleolarsubstanz adsorbiert wurde, mit seiner Funktion und seinem Aufbau aber nichts zu tun hat. Die im Nukleolus auffindbare RNS. scheint nicht einheitlicher Natur zu sein[22]. Es lassen sich mehrere Polymerisationsstufen nachweisen, woraus auf eine RNS.-Synthese im Nukleolus geschlossen wurde. Da im Nukleolus einige der hierzu notwendigen Fermente bereits nachgewiesen wurden – eine alkalische Phosphatase[23], Adenosintriphosphatase[24] und eine Metaphosphatase[25] – erlangt diese Anschauung eine weitere Wahrscheinlichkeit.

Mit diesen zytochemischen Methoden konnten auch gesicherte Unterschiede zwischen einzelnen Nukleolen nachgewiesen werden. So besitzen zum Beispiel die sechs Nukleolen eines Oozytenkernes einer Assel eine positive Gomorireaktion auf Monophosphatase, während nur in drei von ihnen eine Diphosphatase nachweisbar ist[26]. Die Oozytennukleolen von *Helix* und *Tachea* geben einen positiven Argininnachweis[27], während er zum Beispiel bei *Acetabularia* negativ ist. Auf frühen Furchungsstadien von *Cyclops strenuus* sind die Nukleolen azidophil, besitzen also keine oder eine relativ geringe Menge an RNS., während sie später, auf älteren Entwicklungsstadien, basophil werden, sich also mit RNS. stark beladen. Diese Beispiele mögen genügen, um die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der Nukleolen zu demonstrieren. Betrachtet man die chemischen, physiologischen und morphologischen Befunde, so lassen sie wohl die Schlussfolgerung zu, dass die Nukleolen keine gleichartigen und einheitlichen Gebilde darstellen. Eine Aufgliederung der Nukleolen erscheint jedoch zur Zeit unzweckmässig, besonders da hierfür notwendige, scharf definierbare Kriterien fehlen. Aber man wird stets in Betracht ziehen müssen, dass die Funktion all der mit dem Namen Nukleolen belegten Kernkörperchen Unterschiede aufweisen kann.

III. *Entstehung von Nukleolen*

Im Gegensatz zu Chromosomen, deren Zahl, Struktur und DNS.-Gehalt[28] konstant den ganzen Lebenszyklus einer Zelle hindurch erhalten bleiben und auch durch den Mechanismus der Mitose konstant weitergegeben werden, unterliegen die Nukleolen einem ständigen Wechsel zwischen Aufbau und Abbau, der bis zur vollständigen Auflösung in der Prophase führen kann. In der darauffolgenden Telophase und Interphase entstehen dann offenbar *de novo* eine gleiche Anzahl Nukleolen. Welche Faktoren determinieren diese Erscheinung?

Heitz[29] fand wohl als erster an verschiedenen pflanzlichen Objekten die Abhängigkeit der Nukleolenbildung von der Anwesenheit bestimmter Einschnürungen an den Chromosomen, den sogenannten «nucleolus organizer». Die Allgemeingültigkeit dieses Prinzipes für fast alle tierischen und pflanzlichen Zellen wurde bald anerkannt. Die Bedeutung der Nukleolenbildungsstellen lässt sich instruktiv an Inversionen und Translokationen von Chromosomenstellen demonstrieren, bei denen der «nucleolus organizer» auseinanderbrach und die einzelnen Teile darauf getrennt voneinander zu liegen kommen. Da jeder Bruchteil die Fähigkeit zur Nukleolenbildung beibehält, kommt es zur Entstehung mehrerer Nukleolen[30]. Die einmal ausgebildeten Nukleolen können sich von den Nukleolusbildungsstellen der Chromosomen trennen und so ohne Zusammenhang mit den Chromosomen in den Kernsaft zu liegen kommen. Hierbei können sie wachsen, sich teilen und Nukleolenblasen ausstossen. Aus dieser morphologischen Unabhängigkeit von den Chromosomen darf jedoch nicht auf eine physiologische geschlossen werden. Erwähnt müssen hier die akzessorischen Kerne[31] werden, die von dem Oozytenkern abgegeben werden, ein RNS.-haltiges Körperchen besitzen und eine negative Feulgenreaktion zeigen. Sie stellen eine Art von Kern mit Nukleolus, aber ohne Chromosomen dar[32]. Leider fehlen weitere zytochemische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen, so dass zur Zeit eine Beziehung dieser akzessorischen Kerne zu dem Problem der Nukleolusentstehung nicht erkennbar ist.

Über Struktur und Aufbau der Nukleolenbildungsstellen sowie über die Art der Nukleolenentstehung ist zur Zeit schwer eine nur einigermassen zuverlässige

[20] H. Callan und S. Tomlin, Proc. Roy. Soc. [B] *137*, 367 (1950).
[21] H. Bauer, Z. Zellf. *18*, 254 (1933).
[22] A. Pollister und C. Leuchtenberger, Nature *163*, 360 (1949).
[23] Zum Beispiel: E. Krugelis, Biol. Bull. *93*, 215 (1947).
[24] Ch. Landschütz, Exper. *6*, 232 (1950).
[25] M. Ross und J. Ely, Exp. Cell Res. *2*, 339 (1951).
[26] M. de Nicola, Micr. Sci. *90*, 391 (1949).
[27] J. Serra und A. Queiroz-Lopes, Chromosoma *2*, 576 (1944).
[28] H. Swift, Rev. Cytology *2*, 1 (1953).
[29] E. Heitz, Planta *12*, 775 (1931); *15*, 495 (1931).
[30] B. McClintock, Z. Zellf. *21*, 284 (1934).
[31] P. Buchner, Arch. mikr. Anat. *91*, 1 (1918).
[32] E. Wolf, *Moderne Biologie*, Festschr. Nachtsheim (Berlin, 1950).

Vorstellung zu entwickeln. Trotzdem möge hier versuchsweise eine allerdings sehr hypothetische Ansicht skizziert werden. Zuerst muss einmal zwischen zwei Alternativen unterschieden werden: der Nukleolus stellt eine Ansammlung von Stoffen dar, die an den verschiedensten Stellen der Chromosomen gebildet wurden, oder aber der Nukleolus entsteht aus einer spezifischen Substanz, die nur an bestimmten Stellen der Chromosomen, den Nukleolenbildungsstellen, lokalisiert ist.

Betrachten wir als Beispiel die Verhältnisse an den Riesenchromosomen der Dipteren. In den Zellkernen der Speicheldrüsen und der Malphigischen Gefässe sind ausser den meist in Ein- oder Zweizahl vorkommenden Hauptnukleolen noch sogenannte Nebennukleolen entwickelt[33]. Es sind dies kleine, bei Lebendbeobachtung dunkel erscheinende Tröpfchen, die an bestimmten Chromosomenorten gebildet werden, von wo sie in den Kernsaft abgestossen werden können, in dem sie sich dann früher oder später auflösen. Die Produktion der Nebennukleolen lässt sich oft auf eine Querbande zurückführen (Abb. 4). Diese enthält RNS. im Gegensatz zu allen anderen Querscheiben, die ausser der Eiweisskomponente hauptsächlich, wenn nicht ausschliesslich DNS. besitzen[34]. Übertragen wir diese an den Riesenchromosomen deutlich erkennbaren mikroskopischen Befunde in die molekulare Dimension, so lässt sich folgende Vorstellung von der Nukleolenbildung entwerfen. Zwischen den höchstwahrscheinlich am Aufbau der Gene beteiligten DNS.-Molekülen liegen im Chromosom noch etliche RNS.-Moleküle (Abb. 4). Entsprechend der Fähigkeit aller Nukleoproteide werden sich auch diese Ribonukleinsäure-Proteide unter geeigneten Bedingungen reduplizieren können (Abb. 4*d*). Auf diese Weise wird eine grössere Menge von Nukleoproteiden entstehen, welche die Nukleolarsubstanz ausmachen. Eine genügend starke Anreicherung dieser Grundsubstanz ergibt schliesslich den mikroskopisch erkennbaren Nukleolus. Die im Chromosom lokalisierten Ribonukleoproteide verkörpern also den «nucleolus organizer». Wie die Desoxyribonukleoproteide der Gene werden auch die Ribonukleoproteide des «nucleolus organizer» konstant von Zelle auf Zelle weitergegeben, wodurch es zu der beobachteten Regelmässigkeit in der Nukleolenentstehung kommt[35].

Eine zweite an den Riesenchromosomen deutlich beobachtbare Erscheinung ist vielleicht weiter verbreitet, als bisher vermutet wurde, und zwar die unter bestimmten physiologischen Zuständen eintretende starke bzw. schwache Ausbildung verschiedener Nebennukleolenstellen[36]. Es ist denkbar, dass Kerne aus verschiedenen Geweben Nukleolen besitzen, die von verschiedenen Chromosomenstellen gebildet wurden. Da wegen der Kleinheit der meisten Kerne eine Lokalisation der Nukleolen zu bestimmten Nukleolenbildungsstellen der Chromosomen nicht möglich ist, könnten leicht Nukleolen verschiedener Ursprünge für ein und dieselben gehalten werden. Dass wirklich unter bestimmten Bedingungen Nukleolen an Chromosomen ausgebildet werden, an denen normalerweise keine mikroskopisch feststellbare Nukleolarsubstanz auffindbar ist, mögen folgende zwei Beispiele zeigen:

a) *Vicia faba* und *montana* haben in ihrem Chromosomensatz zwei sogenannte SAT.-Chromosomen und infolgedessen auch zwei mikroskopisch erkennbare Nukleolen. Durch ab und zu vorkommende Aberration von Chromosomen in der Mitose kann es zur Bildung eines grösseren Hauptkernes kommen, in dem zwei Nukleolen liegen, und zur Entstehung eines kleineren Nebenkernes, der jedoch auch einen kleinen Nukleolus besitzt, obgleich er kein SAT.-Chromosom enthält. Ein anderes Chromosom, das normalerweise keinen sichtbaren Nukleolus produziert, muss die Bildung dieses Nukleolus induziert haben[37].

b) In manchen Zellkernen von Mais finden sich normalerweise zwei Nukleolen. Bei einer bestimmten Kombination von Translokationen von Chromosomenstellen entstehen neben den zwei Nukleolen an allen anderen Chromosomen noch mehr oder minder grosse Nukleolen[30].

[33] H. Bauer, Zool. Jb. *56*, 239 (1936).
[34] J. Schulz, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *12*, (1949).
[35] E. Heitz, Planta *12*, 775 (1931).
[36] W. Beermann, Z. Naturforschg. *7*, 237 (1952).
[37] E. Heitz, Planta *15*, 495 (1931).

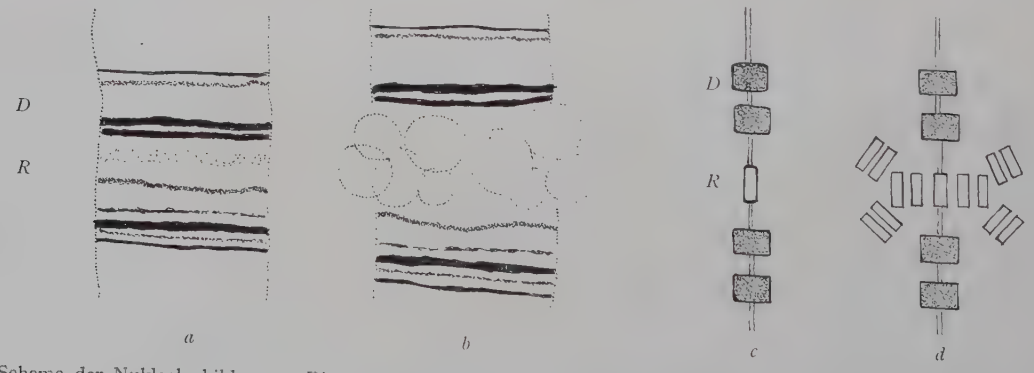


Abb. 4. Schema der Nukleolenbildung. *a* Riesenchromosomen mit DNS.-haltigen Querbanden (*D*) und einer RNS.-haltigen Querscheibe (*R*). *b* An der RNS.-haltigen Querbande entsteht Nukleolarsubstanz. *c* Schema eines Chromatidenteiles mit DNS.-haltigen Genloci und einer RNS.-haltigen Stelle, die den «nucleolus organizer» repräsentiert. *d* Reduplikation der RNS.-haltigen Nukleoproteide an dem «nucleolus organizer», was zur Entstehung der mikroskopisch sichtbaren Nukleolarsubstanz führt.

IV. *Beziehung zwischen Nukleolus und Eiweißsynthese im Zellkern*

In Zellkernen findet eine zum Teil recht erhebliche Synthese von Proteiden statt. Dies wurde teils aus zytochemischen Befunden erschlossen[10], kann jedoch auch direkt durch Anwendung markierter Aminosäuren geprüft werden[38]. Sogar isolierte Kerne besitzen noch die Fähigkeit, angebotene Aminosäuren in Polypeptide einzubauen, vorausgesetzt, dass ihnen energiereiche Phosphate zur Verfügung stehen[39]. Allerdings bedürfen die an isolierten Kernen gemachten Befunde stets einer sehr kritischen Beurteilung, da, wie besonders aus den Versuchen von Holtfreter[40] ersichtlich ist, Diffussions- und Adsorptionsphänomene leicht zu falschen Schlussfolgerungen führen können. Nehmen wir die mit der Funktion des Interphasenkernes korrelierte Neubildung von Proteiden – nicht gemeint ist hier die zu einer Chromatidverdoppelung führende Proteinsynthese in den Chromosomen – als Tatsache an, so erhebt sich die Frage nach demjenigen Kernbestandteil, der hierzu befähigt ist. Um diesen ermitteln zu können, erscheint es vorerst nötig, diejenigen Eigenschaften kennenzulernen, die eiweißsynthetisierende Zellstrukturen auszeichnen.

Eines der konstantesten Merkmale von Zellen bzw. einzelner Zellstrukturen während einer Eiweißsynthese ist die Anwesenheit von Nukleinsäuren. Sowohl DNS. als auch RNS. können bei der Eiweissbildung beteiligt sein. Dies lässt sich besonders schön an Viren demonstrieren, von denen etliche in Pflanzen parasitierende ausschliesslich RNS. besitzen, viele in Bakterien und Tieren vorkommende anderseits nur DNS. aufweisen[41]. Als zweites Merkmal dient, dass die Menge der Nukleinsäure nach der Stärke der Eiweißsynthese variiert: je intensiver diese ist, um so grösser der Nukleinsäuregehalt[10]. Jede Reduplikation von Eiweissen scheint an die Anwesenheit von Nukleinsäuren gebunden zu sein[42]. Eine weitere Präzisierung brachten Versuche mit verschiedenen markierten Vorstufen der Nukleinsäuren. Zellbezirke mit einer starken Eiweißsynthese besitzen nicht nur eine grosse Nukleinsäuremenge, sondern die einzelnen Nukleinsäuremoleküle sind durch einen schnellen Umsatz (turn over) ausgezeichnet[41]. Für diesen Nukleinsäureumsatz ist die Anwesenheit entsprechender Fermente eine notwendige Voraussetzung.

Suchen wir im Zellkern nach denjenigen Strukturen, die den soeben gestellten Anforderungen entsprechen, so kommen die DNS.-haltigen Chromosomen und die RNS.-haltigen Nukleolen in Betracht. Die folgenden Befunde lassen erkennen, dass der Nukleolus als Ort einer Eiweißsynthese im Kern angesehen werden kann. 1. Versuche mit ^{32}P und mit markierten (^{15}N, ^{14}C und ^{13}C)-Purinvorstufen ergaben, dass die DNS. im wesentlichen nur dann einen Einbau aufweist, wenn eine Chromatidverdoppelung erfolgt, also stets vor einer Teilung[43]. Der ^{32}P-Einbau geht weitgehend proportional der Mitoserate[43]. Einmal in die DNS. aufgenommene Isotope werden nur sehr langsam ausgebaut[43]. Die DNS. kann infolgedessen als eine stabile Zellsubstanz mit geringer oder keiner Stofferneuerung angesehen werden. Demgegenüber weist die RNS. der Kerne eine ständige intensive Stofferneuerung auf[43], die nicht mit der Kernteilung, sondern mit der Tätigkeit des Interphasenkernes in Zusammenhang gebracht werden kann. Da der grösste Teil, wenn nicht die gesamte RNS. in der Nukleolarsubstanz oder den Nukleolenbildungsstellen konzentriert ist, lässt sich hieraus auf eine starke Stofferneuerung der RNS. der Nukleolen schliessen.

An Speicheldrüsenkernen von *Chironomus Thummi* ist es gelungen, den RNS.-Umsatz im Nukleolus und den DNS.-Umsatz in den Chromosomen zu messen. Mit Hilfe von ^{32}P und der autoradiographischen Methode konnte an isolierten Chromosomen und Nukleolen der Einbau (Abb. 5*a–c*) und auch der Ausbau

[38] N. Borsook, C. Deasy, A. Haagen-Smith, G. Keighley und P. Lowy, J. Biol. Chem. *184*, 529 (1952).
[39] P. Siekevitz, J. Biol. Chem. *195*, 549 (1952).
[40] J. Holtfreter, Cop. Cell. Research *7*, 95 (1954).
[41] Zum Beispiel: J. Davidson, *The Biochemistry of Nucleic Acid* (Methuen's Monogr., London 1951).
[42] T. Caspersson, Naturwissenschaften *29*, 33 (1941).
[43] Zum Beispiel: S. Smellie, *The Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 393.

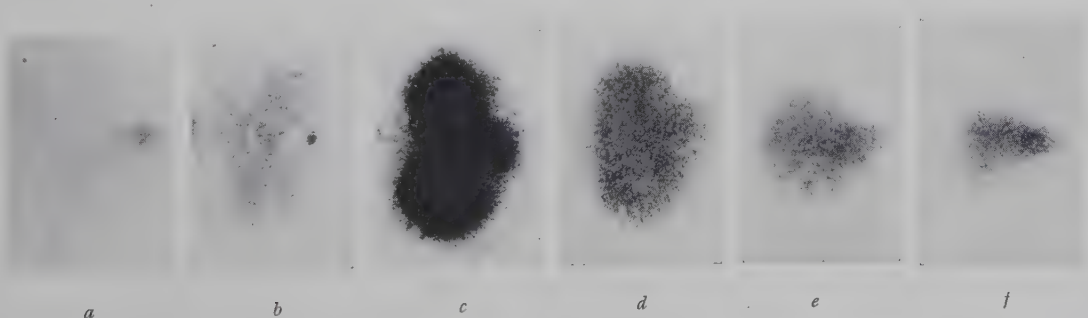


Abb. 5. Autoradiographische Aufnahmen des Einbaues von ^{32}P in isolierte Nukleolen (+ 4-Chromosom) von Speicheldrüsenzellen von *Chironomus Thummi*. *a* 12 h, *b* 24 h und *c* 3 Tage ständige ^{32}P-Applikation, *d* 3 Tage ^{32}P-Applikation und 3 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser, *e* 3 Tage ^{32}P-Applikation und 7 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser, *f* 3 Tage ^{32}P-Applikation und 10 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser.

(Abb. 5*c–f*) bestimmt werden. Der Versuch lässt deutlich die schnelle Stofferneuerung in den ausgewachsenen Nukleolen erkennen. Eine starke RNS.-Synthese konnte auch an den Nukleolen des Acetabulariakernes[44] und des Oozytenkernes von Seeigeln[45] nachgewiesen werden.

2. In den Nukleolen von Kernen von *Zea mays* fanden Pollister und Leuchtenberger[12] verschiedene Polymerisationsstufen der RNS. Aus diesen Versuchen und unseren Ergebnissen an *Acetabularia*[44] kann wohl der Schluss gezogen werden, dass in den Nukleolen eine Synthese der RNS. stattfindet, was auf eine Eiweißsynthese hinweist.

3. Das Vorhandensein einer alkalischen Phosphatase sowie von Adenosintriphosphatase im Nukleolus (siehe Kapitel II) entspricht ebenfalls der Vorstellung, die man von Zellstrukturen mit einer Nukleinsäuresynthese entwickelt hat.

4. Zellkerne von stark wachsenden sowie sezernierenden Zellen besitzen eine wesentlich grössere Produktion von Fermenten und Nukleoproteiden als Kerne in ausgewachsenen Zellen. Da eine starke Eiweissbildung stets eine Vergrösserung der Nukleinsäuremenge benötigt, müssten also diejenigen Strukturen im Zellkern, in denen eine Eiweissbildung stattfindet, eine Variation ihres Nukleinsäuregehaltes aufweisen. Die DNS.-haltigen Chromosomen können ausgeschlossen werden, da ihre Menge in der Interphase auch in Zellen mit starker Eiweissvermehrung konstant bleibt[46]. Demgegenüber entspricht das Verhalten der RNS.-Nukleoproteide des Nukleolus vollkommen der gestellten Forderung: sie nehmen in stark wachsenden sowie sezernierenden Zellen zu, bei nachlassender oder abgeschlossener Eiweissvermehrung wieder ab.

Aus den oben angeführten Gründen erscheint es berechtigt, den Nukleolus als Ort einer Eiweißsynthese im Kern anzusehen und nicht nur als einen Ort, an dem die vom Heterochromatin gebildeten Eiweisse gesammelt werden. Durch genetische Untersuchungen wurde anderseits die ausschlaggebende Bedeutung der Chromosomen für einen normalen Ablauf des Gesamtstoffwechsels und somit also auch des Proteinumsatzes demonstriert. Wir stehen hier vor der Aufgabe, eine Vorstellung zu entwickeln, welche beiden Befunden gerecht wird und sie vereinbart. Zwei Möglichkeiten müssen in Betracht gezogen werden: entweder werden die im Nukleolus synthetisierten Proteine direkt an das Zytoplasma weitergegeben, oder aber die Polypeptide verbleiben im Kern und werden in diesem für weitere Syntheseprozesse verwendet. Eine endgültige Entscheidung lässt sich zur Zeit nicht treffen, doch scheint folgende Ansicht grosse Wahrscheinlichkeit zu haben.

[44] H. Stich und J. Hämmerling, Z. Naturf. *8b*, 329 (1953).
[45] A. Ficq, Exper. *9*, 377 (1953).
[46] F. Schrader und C. Leuchtenberger, Exp. Cell. Res. *1*, 421 (1950).

Aus Versuchen von Haurowitz[47] geht hervor, dass eine Aneinanderkettung von Aminosäuren zu Polypeptiden räumlich und zeitlich getrennt erfolgen kann von der folgenden Faltung dieser Polypeptidkette. Im ersten als auch im zweiten Schritt wird dem neu entstehenden Eiweissmolekül eine Spezifität aufgeprägt. Übertragen wir diese Befunde auf die Verhältnisse im Kern, so könnte man sich vorstellen, dass im Kern selbst eine Arbeitsteilung erfolgte in Orte, in denen eine Neubildung von Polypeptiden erfolgt, und in Orte, an denen dieser Kette eine räumliche Spezifität verliehen wird. In den Nukleolen würde eine Verkettung der Aminosäuren zur Polypeptidkette erfolgen, was mit dem starken Stoffwechsel dieser Stellen gut vereinbar wäre. An den DNS.-haltigen Chromosomen würde die spezifische Faltung erfolgen, vielleicht in einer Art von Antigen-Antikörper-Reaktion.

In den oben erwähnten Ansichten wurde die RNS. des Nukleolus stets mit der Eiweißsynthese dieser Kernstruktur in Verbindung gebracht. Demgegenüber besteht die Hypothese, dass Kern und mithin Nukleolus als Produktionszentrum der RNS. der Zelle funktioniert. Als Stütze hierfür wurde der schnellere Umsatz der RNS. des Kernes im Vergleich zu der RNS. des Zytoplasmas angeführt[48]. Zwei Befunde lassen sich gegen diese Ansicht hervorbringen: erstens kann in kernlosen Zytoplasmateilen eine zum Teil recht beachtliche RNS.-Synthese stattfinden (zum Beispiel bei *Acetabularia*[49]), und zweitens müsste die molekulare Zusammensetzung der RNS. des Zytoplasmas der RNS. des Kernes entsprechen, was jedoch nicht der Fall ist[48].

V. *Die Steuerung der Nukleolusfunktion durch den Energiezustand des Zytoplasmas*

Die Ausprägung der Nukleolarsubstanz unterliegt in gleichen Geweben, sogar in der gleichen Zelle zu verschiedenen Zeiten grossen Volumenschwankungen. Eine gewisse Gesetzmässigkeit liess sich beim Vergleich von Zelltypen verschiedener Funktion erkennen. Embryonale, noch wachsende, sezernierende und regenerierende Zellen (zum Beispiel Nervenzellen) haben einen relativ grossen Kern mit stark entwickelter Nukleolarsubstanz, während in anderen auch «aktiven» Zellen, wie zum Beispiel in Muskeln, Bindegewebe, kernhaltigen Erythrozyten und weissen Blutkörperchen das Nukleolusvolumen sehr klein ist. Der wesentlichste Unterschied dieser Zelltypen liegt in der Stärke der Eiweissproduktion. Hieraus geht eine Korrelation zwischen Nukleolus und Eiweißsynthese im

[47] F. Haurowitz und J. Crampton, Exp. Cell. Res. [Suppl.] *2*, 45 (1952).
[48] J. Brachet, *Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 476.
[49] F. Vanderhaeghe und D. Szafarz, Arch. Intern. Physiol. Biochim. *63*, 267 (1955).

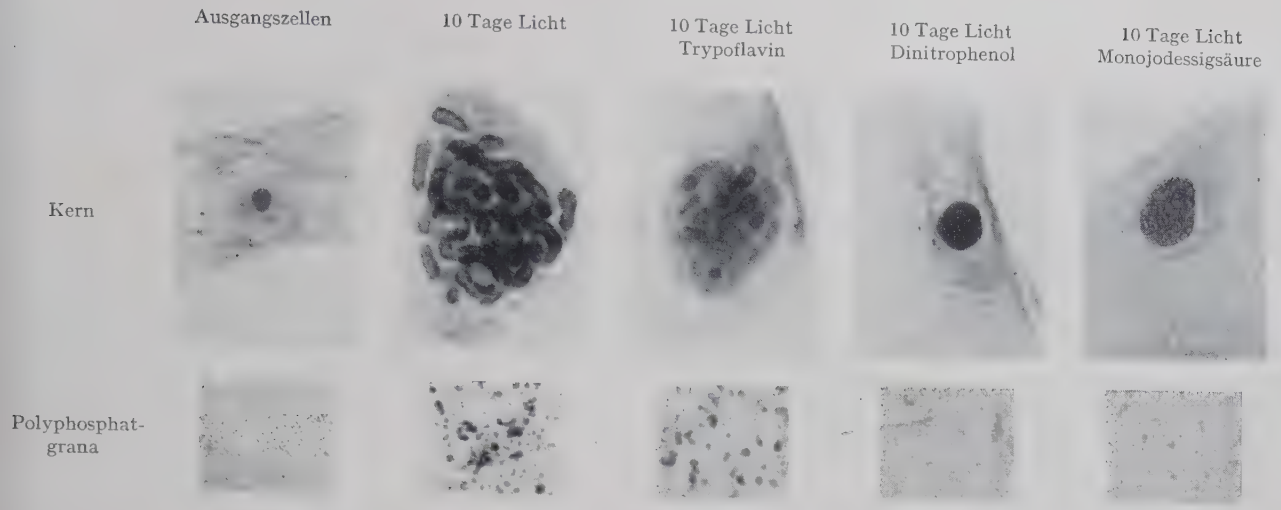


Abb. 6. Das Verhalten der Kerne und Polyphosphate im Zytoplasma von *Acetabularia mediterranea* nach 10tägiger Belichtung und bei gleichzeitiger Applikation von Giften. (Die auf der Abbildung des Zytoplasmas der Ausgangszellen sichtbaren Strukturen sind Plastiden, nicht Polyphosphatgrana wie auf den folgenden Photos.)

Zytoplasma hervor[10]. Diese gilt gleichermassen für autotrophe und heterotrophe Zellen.

Über die Art dieser Beziehung lassen sich zwei verschiedene Ansichten äussern: entweder bewirkt der grössere Kern und Nukleolus eine stärkere Eiweisssynthese im Zytoplasma, oder aber die grössere Zytoplasmatätigkeit bestimmt eine Vergrösserung des Kern- und Nukleolusvolumens. Berücksichtigt man die biochemischen Befunde über den Stoffwechsel einzelner Zellstrukturen, so lässt sich folgende Vorstellung über den Einfluss des Zytoplasmas auf die Kern- und Nukleolustätigkeit machen. In den Mitochondrien wird durch die oxydativen Vorgänge des Krebszyklus Energie frei, die ursprünglich zum grössten Teil in Form von energiereichen Phosphaten gebunden wird[50]. Diese energiereichen Phosphorverbindungen gelangen nun in die Zelle und liefern für die im Kern ablaufenden enderogenen Vorgänge, wie zum Beispiel die Synthese von Nukleinsäuren, Proteiden, Lipoiden die Energie. Die für eine Spaltung der energiereichen Phosphate notwendigen Fermente sowie die ATP. selbst konnten im Kern nachgewiesen werden[51]. Die Annahme liegt nahe, dass die Kerntätigkeit durch diesen Nachschub aus dem Zytoplasma gesteuert wird.

Durch Versuche an *Acetabularia* konnten die aus biochemischen Befunden abgeleiteten Anschauungen weitgehend bewiesen werden. Unterband man bei *Acetabularia* durch 2,4-Dinitrophenol, Monojodessigsäure oder Verdunkelung die Synthese von energiereichen Phosphorverbindungen[52], die in Form von Polyphosphaten nachgewiesen wurden[53], so führte dies zu einer Verkleinerung der Zellkerne. Beginnt man den Versuch an kleinen Zellen mit kleinem Kern und Nukleolus und prüft die Ausbildung der Polyphosphatgrana sowie die Vergrösserung des Zellkernes und des Nukleolus, so erkennt man, dass nur in Zellen mit vielen Polyphosphatgrana ein grosser Kern vorkommt, während in Zellen mit keinen oder wenigen Polyphosphaten die Kerne klein sind (Abb. 6). Diese morphologischen Befunde konnten durch eine Messung des ^{32}P-Einbaues in Zellkern und Polyphosphatgrana erweitert werden. Nach 2,4-Dinitrophenol und Verdunkelung wurde einerseits der ^{32}P-Einbau in die Polyphosphatgrana stark reduziert, anderseits nimmt auch die ^{32}P-Einlagerung in die organischen Substanzen

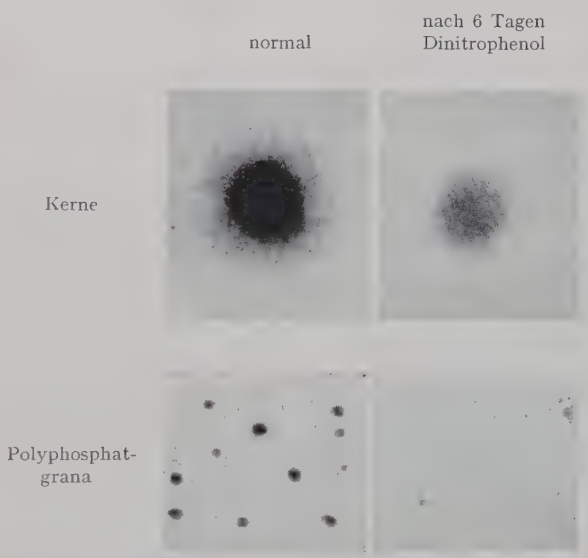


Abb. 7. Der Einbau von ^{32}P (2 Tage) in normale und mit 2-4-Dinitrophenol behandelte Kerne und Polyphosphatgrana von *Acetabularia mediterranea*.

[50] O. Lindberg und L. Ernster, Protoplasmatologia *3A*, 4 (1954).

[51] K. Lang und G. Siebert, *Der Stoffwechsel*, Bd. *1* (Springer-Verlag, Berlin 1954), S. 1064.

[52] H. Stich, Z. Naturf. *6b*, 319 (1951); Chromosoma (1955) (in press).

[53] H. Stich, Z. Naturf. *8b*, 36 (1953).

des Zellkernes stark ab, wie aus Abbildung 7 deutlich erkennbar ist.

Aus diesen Befunden lässt sich die oben gemachte Annahme weitgehend begründen, dass die morphologischen Kernänderungen, der Umsatz des Kernes und des Nukleolus sowie schliesslich auch der Wirkungsgrad des Kernes und des Nukleolus, worauf ausdrücklich von Hämmerling[54] hingewiesen wird, vom Zytoplasma aus über die Menge der energiereichen Phosphorverbindungen gesteuert wird. Anderseits ist, wie zahlreiche Versuche erkennen lassen, die Korntätigkeit Voraussetzung eines normalen Stoffwechsels des Zytoplasmas. Dies lässt sich deutlich an Zellen demonstrieren, bei denen der Kern entfernt wird. Im Verhältnis zu den kernhaltigen Zellen werden in den kernlosen Teilen früher oder später viele Syntheseprozesse reduziert, was schliesslich zum Tode dieser Teile führt[55]. Die Befunde zeigen, dass innerhalb der Zelle eine enge Wechselwirkung zwischen Kern und Zytoplasma besteht: der Kern ist von der Energie abhängig, die ihm durch die Mitochondrien zur Verfügung gestellt wird, während anderseits die Vorgänge des Zytoplasmas die Tätigkeit des Kernes benötigen. Für eine eingehende Darstellung dieser Kreisprozesse sei auf Hämmerling[54] verwiesen.

[54] J. Hämmerling, Rapp. Comm. 8me Congr. intern. Bot., Paris 1954 (im Druck).

[55] J. Hämmerling, Naturwissenschaften *33*, 337 und 361 (1946); Rev. Cytology *2*, 475 (1953). – J. Brachet, *The Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 476.

Summary

In previous years the composition and function of chromosomes have been analyzed to a considerable extent, in contrast to the small number of investigations that have been made on nucleoli. There exist at present many conflicting opinions about the structure and function of the nucleolus, and therefore a critical survey of the facts and theories about the nucleolar substance appears necessary.

The structure, chemical composition and metabolism of the nucleoli of various cells are described in this publication. The regulation of the size and function of the nucleolus is also discussed.

It is concluded that the size and structure of the nucleolus is organ- and species-specific. A rapid synthesis of RNA and proteins occurs in the nucleolus. After a short interval, this disappears; and it is therefore concluded that the nucleolus must have a high turnover of these substances. The size and function of the nucleoli depends on the energy state of the cytoplasm.

It appears that the nucleolus can synthesize proteins which can be utilized by the chromosomes during their genetic function.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

A Closed Expression for Certain Probabilities in Wilcoxon's two Sample Test

Consider two samples of sizes n_1 and n_2 respectively, drawn from two univariate distributions. Call a value observed in the first sample a 1-value, and a value observed in the second sample a 2-value. Suppose that no 1-value equals any 2-value (when the underlying distributions are continuous, the probability of this occurrence is one). Form all possible pairs consisting of one 1-value and one 2-value. There are $n_1 n_2$ such pairs. Call those pairs among them in which the 1-value is smaller than the 2-value 1-2-pairs, and the pairs in which the 2-value is smaller than the 1-value 2-1-pairs. Denote the number of 1-2-pairs by U_{12} and the number of 2-1-pairs by U_{21}. Then:

$$U_{12} \geqq 0, \quad U_{21} \geqq 0, \quad \text{and } U_{12} + U_{21} = n_1 n_2.$$

If one repeatedly draws two samples of sizes n_1 and n_2 from two (univariate) distributions, one will not find the same number of 1-2-pairs with each repetition. Let $P(U_{12} = u,; n_1, n_2)$ denote the probability that the number of 1-2-pairs to be formed from two samples of sizes n_1 and n_2 is u, this probability being understood to be calculated under the hypothesis tested by Wilcoxon's two sample test (of which hypothesis the hypothesis that the $N = n_1 + n_2$ values are independently drawn from two identical distributions is a particular case). After this definition the definition of $P(U_{21} = u;\ n_1, n_2)$, $P(U_{12} \leqq u;\ n_1, n_2)$ and $P(U_{21} \leqq u;\ n_1, n_2)$ will be immediately clear. The last-named probability has been tabulated (in a triple-entry table of course) by Mann and Whitney[1] for $n_2 \leqq n_1 \leqq 8$, by van der Vaart[2]

[1] H. B. Mann and D. R. Whitney, Ann. Math. Stat. *18*, 50 (1947).

[2] H. R. van der Vaart, *Gebruiksaanwijzing voor de tests van Wilcoxon*, Rapport S 32 (M4) van de Statistische Afdeling van het Mathematisch Centrum, Amsterdam, with tables (1950), obtainable from the Mathematisch Centrum, Amsterdam; *cf.* the more detailed Rapport S 176 (M 65) van de Stat. Afd. v. h. Math. Centr., obtainable

(with more significant figures) for $n_2 \leqq n_1 \leqq 10$. Other tables are those by FESTINGER[3], by WHITE[4], and by AUBLE[5], which, however, are found to have been criticized for containing more or less serious errors. Using generating functions KEMPERMAN[6] has indicated a method by which to calculate the above probabilities by means of a double-entry table instead of a triple-entry table; he gave such a double-entry table covering the cases for which $u \leqq 40$ and $n \leqq 5$ [$n = \text{Min}\ (n_1, n_2)$, the size of the smallest sample]. Essentially the same method was quite recently re-discovered (without the use of generating functions) and set forth in a detailed paper by FIX and HODGES[7] who gave the double-entry table needed in case $u \leqq 100$ and $n \leqq 12$. Some old work on partition theory, to be discussed in another paper, gives extensive tables closely connected with the last-mentioned two tables: EULER (1748, 1750) covering the cases $u \leqq 69$ and $n \leqq 11$, and $u \leqq 59$ and $n \leqq 20$, respectively, and MARSANO (1870) covering the case $u \leqq 103$ and $n \leqq 102$.

Now, in some other work on partition theory, BRIOSCHI[8], we found a result, dispensing with tables altogether, which we traduct here in terms of Wilcoxon probabilities. The result is interesting because it answers for the two sample problem a question left open by KRUSKAL[9] with respect to the several sample problem in general: namely, the question of a closed expression for certain probabilities in rank tests for the k ($\geqq 2$) sample problem. Moreover, the result allows one to calculate the exact probabilities in virtually all cases not covered by the tables one may have at hand: in fact, no table is needed at all – though for u large the calculations may turn out to be somewhat cumbersome.

The result, then, is this:

If k is a positive integer as well as i, define

$$\delta(k/i) = 1 \text{ if } k/i \text{ is an integer, and } 0 \text{ if } k/i \text{ is not.}$$

Furthermore define

$$s_k = \sum_{i=1}^{n_2} i \cdot \delta(k/i) - \sum_{i=1}^{n_2} (n_1+i) \cdot \delta(k/(n_1+i)).$$

It is clear that interchanging n_1 and n_2 leaves the value of s_k unaltered; hence if $n_2 < n_1$ the version here given will be chosen; if $n_2 > n_1$ one will prefer to interchange n_1 and n_2 in the expression for s_k. Finally define

$$\Delta(s, 0) = 1, \quad \Delta(s, 1) = s_1,$$

$$\Delta(s, u) = \begin{vmatrix} s_1 & -1 & 0 & \cdots & 0 \\ s_2 & s_1 & -2 & \cdots & 0 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ s_{u-1} & s_{u-2} & s_{u-3} & \cdots & -(u-1) \\ s_u & s_{u-1} & s_{u-2} & \cdots & s_1 \end{vmatrix} \quad \text{for } u \geqq 2,$$

and

$$s^*_k = 1 + s_k, \quad {}^*s_k = -1 + s_k,$$

while the definition of

$$\Delta(s^*, u) \quad \text{and} \quad \Delta({}^*s, u)$$

be identical with that of $\Delta(s, u)$ except for the symbol s being replaced by s^* and ${}^*s$, respectively. Then if u be smaller than $\frac{1}{2}n_1n_2$:

$$P(U_{12} = u; n_1, n_2) = P(U_{21} = u; n_1, n_2) = (n_1!\, n_2!/N!\, u!)\, \Delta(s, u),$$
$$P(U_{12} \leqq u; n_1, n_2) = P(U_{21} \leqq u; n_1, n_2) = (n_1!\, n_2!/N!\, u!)\, \Delta(s^*, u),$$

while if in addition $u \geqq 1$:

$$P(U_{12} = u; n_1, n_2) - P(U_{12} = u-1; n_1, n_2) = (n_1!\, n_2!/N!\, u!)\, \Delta({}^*s, u).$$

For example $P(U_{12} \leqq 7; 49, 2) = 0{\cdot}015686$,
$P(U_{12} \leqq 23; 21, 5) = 0{\cdot}028717$.

A self-contained, mainly expository paper with proofs and details on applications is being prepared. Research on other connections between rank tests and the theory of partitions is in progress.

H. R. VAN DER VAART

Zoological Laboratory of the University, Leiden, August 23, 1955.

Zusammenfassung

Gewisse Wahrscheinlichkeiten, welche in der Anwendung von Wilcoxons Test für das Problem der zwei Stichproben wichtig sind, werden mittels einer Determinante geschlossen ausgewertet. Diese Determinante wurde bereits von BRIOSCHI auf ein Problem in der Theorie der Partitionen von ganzen Zahlen angewandt.

from the same source and written by D. WABEKE and C. VAN EEDEN (1955), who give an additional table slightly extending the preceding ones.

[3] L. FESTINGER, Psychometrika *11*, 97 (1946).

[4] C. WHITE, Biometrics *8*, 32 (1952).

[5] D. AUBLE, Bull. Inst. educat. Res. Indiana Univ. *1*, No. 2, 39 (1953); cited after: E. FIX and J. L. HODGES, Jr., Ann. Math. Stat. *26*, 301 (1955).

[6] J. H. KEMPERMAN, *De verdelingsfunctie van het aantal inversies in de test van Mann en Whitney*, Rapport T.W. 7, March 1950, Mathem. Centr., Amsterdam.

[7] E. FIX and J. L. HODGES, Jr., Ann. Math. Stat. *26*, 301 (1955).

[8] F. BRIOSCHI, Ann. Sci. mat. fis. (compilati da B. TORTOLINI) *7*, 303 (1856).

[9] W. H. KRUSKAL, Ann. Math. Stat. *23*, 525, 536 (1952).

Electro-optical Shift

Little work appears to have been done on the properties of liquid dielectrics under high electrical fields (direct or alternating). The effect of an electrical field on viscosity[1], on refractive index[2], on internal friction[3] and on the optics[4] of the system has been studied. In conjunction with research on liquid crystals[5] and liquid dielectrics in progress in this laboratory, it was observed that a beam of white light passing through a liquid dielectric can be shifted in its path upon application of an electrical field. Since work, to date, is of a preliminary nature, the present disclosure must be limited in detail.

A typical cell used to study the electro-optical shift consisted of a 50 ml beaker into which two semi-circular metal electrodes are inserted and held rigidly in place. The electrodes in this study were machined from brass. These electrodes are of such a size that they fill the beaker with the exception of a spacing of 5 mm at the center of the beaker and are mounted so that their faces are parallel. The liquid dielectric under study is placed in the space between the electrodes. The spacing between the electrodes is not critical; the important factors controlling it are arcing and voltage supply.

[1] E. N. DA C. ANDRADE, Proc. roy. Soc. (London) [A] *215*, 36 (1952).

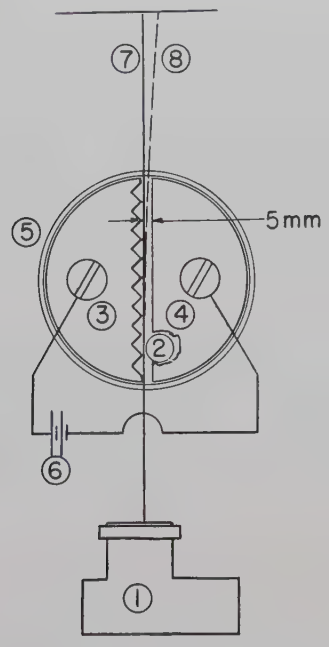
[2] M. PAUTHENIER, C. r. Acad. Sci. *178*, 1899 (1924).

[3] JAN VAN CALKER and B. AUBKE, Z. Physik *131*, 443 (1952).

[4] J. KERR, Phil. Mag. *50*, 337 (1875).

[5] *Shedding Light on Liquid Crystals*, Chem. Eng. News *32*, 2962 (1954).

The surfaces of the faces of the electrodes which are in contact with the liquid dielectric should be corrugated for the best results. The tool of a shaper can easily make such corrugations if a course feed is used. A satisfactory spacing between ridges on the corrugated surface is one-sixteenth of an inch. Also, other spacings of one-thirty second and one-eighth of an inch between the ridges on the electrical surface have been studied and found to give the shift phenomenon. However, it has been found that a mechanically smooth electrode surface (electrically conducting glass) can also bring about a shift. The degree of shift with the smooth surface is not as pronounced for a given liquid dielectric as with a roughened surface.



Topview of Electro-optical Shift Apparatus. *1* Source of white light producing beam 1 mm in diameter; *2* liquid dielectric in space between electrodes; *3* and *4* electrodes; *5* glass container; *6* 5000 volt source ac or dc; *7* path of light beam in absence of field; *8* path of light beam with field applied.

A beam of white light 1 mm in diameter is passed through the liquid dielectric and along the face of the corrugated electrode. The path of the light is parallel to the electrode surface and perpendicular to the shaper tool marks. It should just contact the ridges of the corrugated surface as it passes along the electrode. Also, the path of the light beam is perpendicular to the direction of the electrical field. The distance of liquid traversed is approximately 4 cm. As far as is known at the present time, this distance is not critical. The strength of the electrical field used across the 5 mm spacing is of the order of 1000 volts per millimeter. The field can be either direct current or alternating current. In addition to the white light, Wratten filters of 425, 525 and 650 millimicrons were used. The light in all three cases was shifted as would be expected.

With the light beam passing along the electrode as described above, the light beam will be shifted from its original path when an electrical field is impressed across the electrodes. A shift of the light beam approximately one degree has been recorded with some liquids. The shift is always away from the electrode surface.

In the preliminary study on the electro-optical shift phenomenon, several organic liquids have been tested in the cell. Typical liquids which have been tested and found to give the shift are: ethyl acetate, absolute ethyl alcohol, absolute methyl alcohol, secondary butyl alcohol, tertiary amyl alcohol, carbon disulfide, nitrobenzene, chloroform, and p-tolyl acetate. It is important that the liquids used should be of a high degree of purity.

Studies are still too fragmentary to state conclusively the cause of this electro-optical shift, but it appears that the shift of the light beam is due to the molecular associations in the liquid dielectric concentrating and orienting in the electrical field of highest gradient thus changing the refractive index of the liquid at the electrode surface.

Research is continuing in our laboratory on the experimental and theoretical interpretation of this phenomenon.

G. H. Brown, J. F. Dreyer, H. R. Lubowitz, and W. H. H. Middendorf

Department of Chemistry and Electrical Engineering, University of Cincinnati, Cincinnati 21, Ohio, September 5, 1955.

Zusammenfassung

Erzeugt man in einem flüssigen Dielektrikum, wie wasserfreiem Äthanol, Schwefelkohlenstoff, p-Tolylazetat oder Nitrobenzol, zwischen speziell gestalteten Elektroden ein elektrisches Feld von etwa 10000 V/cm, so wird ein Lichtstrahl, der die im Feld befindlichen Teile der Flüssigkeit durchsetzt, gekrümmt. Die Ablenkung des Strahls aus der geraden Richtung beträgt in manchen Fällen 1°.

Variations in the Calcification of Cementum and Dentin as Seen by the Use of Microradiographic Technique

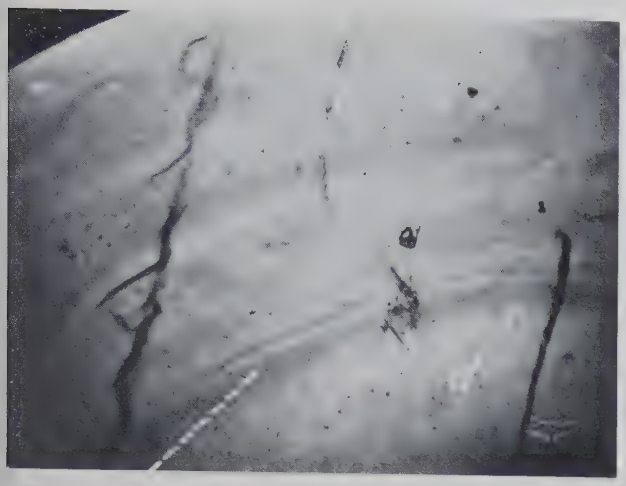
Roentgen absorption images of small biological objects were first published by Goby[1]. He investigated Foraminifera and introduced the name microradiography.

The publication opened new views and possibilities to investigate different tissues on histological basis. Dauvillier[2] took a great step forward towards a better technique by using the so-called Lippmann film with its extremely fine grained emulsion.

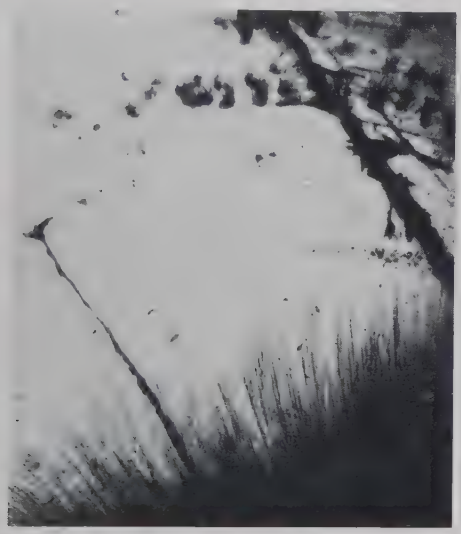
The method has been further improved by Lamarque and Turchini[3]. In 1936 Siewert[4] among other things showed the possibility of getting enlarged roentgen images working with divergent radiation.

In the nineteen forties, important investigations were made in this subject by Clark and Bohatyrtschuk[5]. The latter e.g. investigated the distribution of vessels. Engström[6] published a quantitative method for the estimations of small amounts of different elements in biological objects in areas down to 10 μ. Engström, Engfeldt, and Amprino[7] have published most interesting microradiograms of bone tissue showing the mineral

[1] P. Goby, J. roy. micr. Soc. *4*, 373 (1913).
[2] A. Dauvillier, C. r. Acad. Sci. *190*, 1287 (1930).
[3] P. Lamarque, Radiology *27*, 563 (1936); Brit. J. Radiol. *11*, 425 (1938). – J. Turchini, Bull. histol. appl. physiol. pathol. techn. microscop. *14*, 17 (1937).
[4] R. Siewert, Acta radiol. *17*, 299 (1936).
[5] F. Bohatyrtschuk, Acta radiol. *25*, 351 (1944).
[6] A. Engström, Acta radiol. [Suppl.] *63* (1946).
[7] R. Amprino and A. Engström, Acta anat. *15*, 1 (1952). – A. Engström and B. Engfeldt, Exper. *9*, 19 (1953).



a

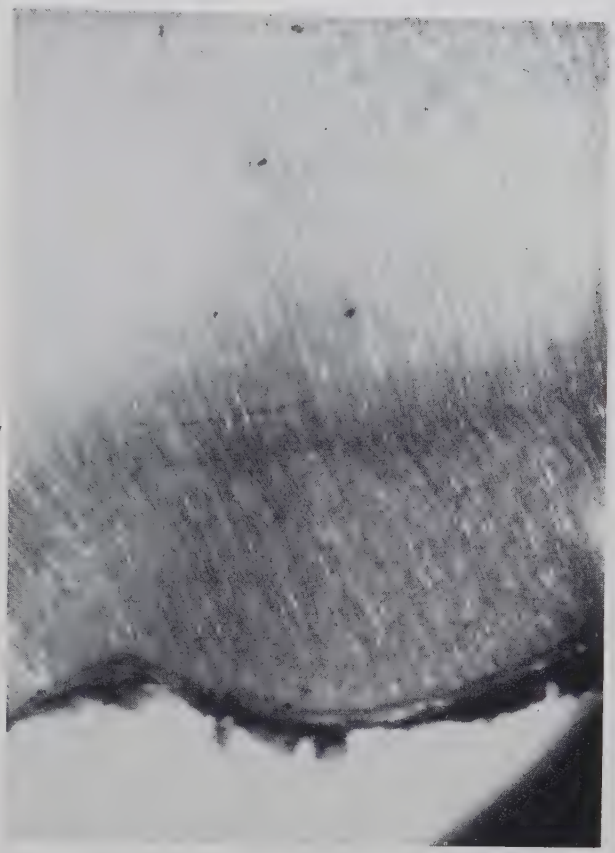


b

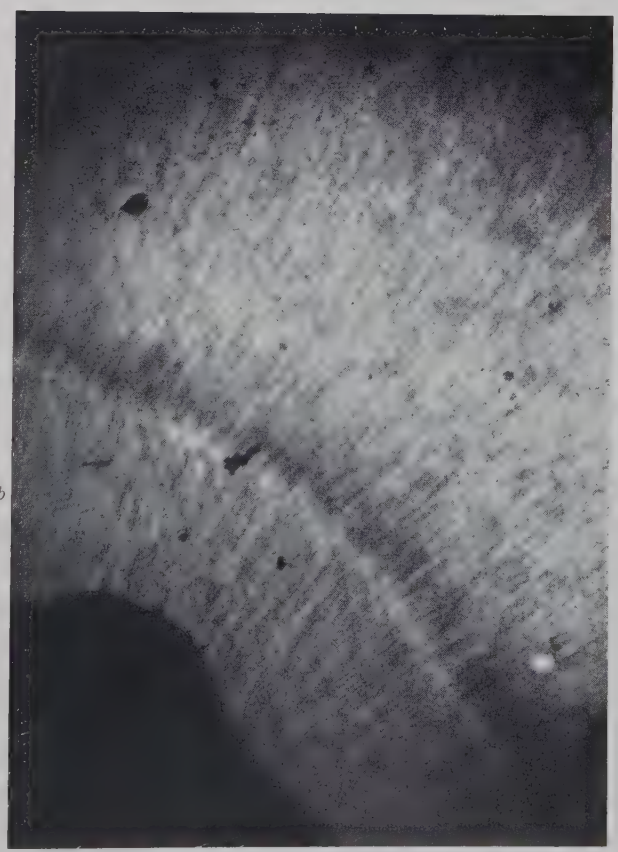
Fig. 1. 5 + ♀ aged 51. *c* = cementum, *d* = dentin. Thickness about 40 μ. *a* Microradiogram exposed 60 min at 2·5—4 Å. Notice the dark line at the arrow point (see text); (the dots in the dentin are artefacts). *b* Microphoto of the same section × 64.

distribution of the Haversian systems. ENGSTRÖM and LINDSTRÖM[8] elaborated a method for estimation of the mass of cytological material by using roentgen absorption technique. Quantitative methods have been reported by BRATTGÅRD and HYDÉN[9] too. Finally, LINDSTRÖM[10] has given a detailed report of the whole microradiographic field and of what has been done for its development.

With special applications to teeth BÖDECKER and APPLEBAUM[11] made the first microradiographic investigations. HEIWINKEL and APPLEBAUM[12] published further



a



b

Fig. 2. + 2♀ aged 51. Thickness about 40 μ. *a* Microphoto. *b* Microradiogram of the same section exposed 60 min at 2·5—4 Å. × 64.

[8] A. ENGSTRÖM and B. LINDSTRÖM, Biochim. biophys. Acta *4*, 351 (1950).

[9] S.-O. BRATTGÅRD and H. HYDÉN, Int. Rev. Cytol. *3*, 455 (1954).

[10] B. LINDSTRÖM, Acta radiol. [Suppl.] *125* (1955).

[11] C. F. BÖDECKER and E. APPLEBAUM, Dental Cosmos *73*, 995 (1931).

[12] E. APPLEBAUM, J. dent. Res. *12*, 619 (1932). – M. HEIWINKEL, Vjschr. Zahnheilk. *48*, 247 (1932).

investigations of the same subject. However, the technique was very imperfect, but in 1933 Applebaum, Hollander, and Bödecker[13] managed to get radiograms of the minute structures of the teeth. Next year Warren *et al.*[14] published a semi-quantitative method for estimating the relative calcium content in different parts of a tooth.

Other investigators are e.g. van Huysen, Hodge, Thewlis, and Lefkowitz[15] working with the mineral distribution of intact or carious teeth. Several interesting findings have been published by these authors, e.g. the highly absorbing Mackie-line in the superficial layer of the enamel. The mineral distribution in osteogenesis imperfecta and in cases of osteopetrosis is studied by Bergman, Engfeldt and Hammarlund-Essler[16].

The microradiographic technique makes it possible to correlate the calcium distribution of teeth directly to the morphological structures. This is possible by exposing ground sections of teeth (in this case 20–30 μ thick) to roentgen radiation within a narrow wave length region, here 2·5–5 Å. The absorption curve of calcium has its K-edge at 3·07 Å. A Machlet type AEG 50 tube (1 mm Be filter) has been used[17].

Some parts of the dentin and the cementum contain great amounts of organic components, e.g. the dentinal tubules and the cementocytes. Consequently in the radiograms these parts appear as black areas in contrast to their surroundings. However, the more calcified areas show a distinct variation in the mineralisation. In the radiograms close to the pulp the dentin often shows a zone containing more calcium than the surroundings (Fig. 2*b*). In the periphery of the dentin at the dentin-cementum junction, a hypocalcified zone appears practically constant (Fig. 1*a*). In decalcified sections stained with Sudan B Lorber[18] has published a similiar picture with a dark zone at the same place containing a concentration of lipids.

A more inconstant appearance but by no means unusual is the presence of bands in the cementum due to rhythmical mineralisation. The microradiograms show that the cementocytes are sometimes situated between the bands. These are present mostly in teeth with branching roots and they appear most distinctly in cross sections from the bifurcation of the root. In this case the absorption of the light bands is 1·5–2 times bigger than that of the darkest band. (The absorption is registered by a microphotometer constructed by Bourghardt, Brattgård, Hydén, Jiewertz, and Larsson[19].)

It is evident that in the cementum a rhythmical mineralisation is present although its appearance here is a little more difficult to show. The bands might originate because of nutritional factors, e.g. illness, starvation and so on, like the transverse lines of childrens' long bones described by Asada, Eliot *et al.*[20]. In both cases (see Figures texts) the enamel shows no Hunter-Schreger bands and only a few lines of Retzius. However, the latter appear very distinctly.

H. Röckert

Histological Institute, University of Gothenbury, September 1, 1955.

Zusammenfassung

Nach einer Übersicht über die Literatur werden die folgenden Befunde angeführt:

1. Eine hyperkalzifizierte Zone im Dentin nahe der Pulpa.
2. Eine hypokalzifizierte Zone an der Grenze zwischen Dentin und Zement.
3. Banden im Zement, verursacht durch rhythmische Mineralisation.

Mikroradiogramme und Mikrophotographien derselben Zahnschnitte werden miteinander verglichen und so die zytochemischen Befunde in Zusammenhang gebracht mit dem zytologischen Bild.

[13] E. Applebaum, F. Hollander, and C. F. Bödecker, Dental Cosmos *75*, 1097 (1933).

[14] S. L. Warren, F. W. Bishop, H. C. Hodge, and G. van Huysen, Amer. J. Roentgenol. *31*, 663 (1934).

[15] G. van Huysen, H. G. Hodge, S. L. Warren, and F. W. Bishop, Dental Cosmos *75*, 729 (1933). – G. van Huysen, H. G. Hodge, and S. Warren, J. dent. Res. *16*, 243 (1937). – J. Thewlis, Brit. Dent. J. *57*, 457 (1934); *62*, 303 (1937). – W. Lefkowitz, J. dent. Res. *19*, 47 (1940). – F. Hollander and E. Saper, Dental Cosmos *77*, 1187 (1935).

[16] G. Bergman and B. Engfeldt, Acta odont. Scand. *12*, 99 (1954); *2*, 133 (1954); Acta pathol. microbiol. Scand. *35*, 537 (1954). – B. Engfeldt, G. Bergman, and E. Hammarlund-Essler, Exper. Cell Res. *7*, 381 (1954).

[17] A. Engström and S. Welin, Acta radiol. *31*, 483 (1949).

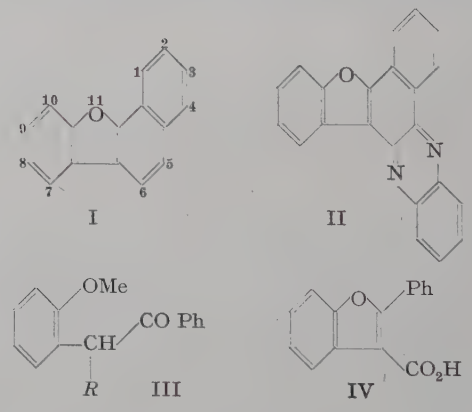
[18] M. Lorber, Anat. Rec. *111*, 129 (1951).

[19] S. Bourghardt, S.-O. Brattgård, H. Hydén, B. Jiewertz, and S. Larsson, J. Sci. Instr. *30*, 464 (1953).

[20] T. Asada, Zbl. Kind. *18*, 705 (1925). – M. M. Eliot, S. P. Souther, and E. A. Park, Bull. Johns Hopkins Hosp. *41*, 364 (1927).

A Synthesis of α-Brazan and the Related Quinone

Kruber and Oberkobusch[1] have isolated α-brazan[2] (I, m. p. 103–104°) from coal tar distillation products. On oxidation with chromic acid, this compound gave, along with other products, α-brazanquinone which was isolated as the quinoxalin derivative (II, m.p. 252–253°). A simple synthesis of both these compounds is now reported.



The keto-nitrile (III, R = CN, m.p. 88–89°) obtained by the condensation of ethyl benzoate with *o*-methoxyphenylacetonitrile[3] gave the related ester (III, R = COOEt, m.p. 71–72°) on treatment with alcoholic hydro-

[1] O. Kruber and R. Oberkobusch, Ber. dtsch. chem. Ges. *84*, 831 (1951).

[2] A. M. Patterson and L. T. Capell, *The Ring Index*, R. I. No. 2482.

[3] W. Baker, H. B. Harborne, and W. D. Ollis, J. chem. Soc. *1953*, 1860.

gen chloride[4]. This was converted into 2-phenylcoumarone-3-carboxylic acid (IV, m.p. 195°; amide, m.p. 261°) by aluminium chloride in benzene. This was followed by homologation by ARNDT-EISTERT procedure to 2-phenylcoumarone-3-acetic acid (m.p. 142–143°; *p*-toluidide, m.p. 209°) which underwent cyclization in quantitative yield to 5-hydroxy-α-brazan (m.p. 204 to 205°) with phosphoric anhydride in benzene[5]. On oxidation with chromic acid in acetic acid, this α-naphthol gave a mixture of quinones from which (II, m.p. 250 to 253°) was isolated on treatment with *o*-phenylenediamine. Reduction of the hydroxy brazan with boiling hydriodic acid gave α-brazan (m.p. 102–103°) identical with an authentic specimen.

J. N. CHATTERJEA

Chemical Laboratory, Science College, Patna, India, September 8, 1955.

Résumé

On décrit une methode pour la synthèse des α-brazan et α-brazanquinone de KRUBER.

[4] W. WISLICENUS, H. EICHERT and M. MARQUARDT, Ann. Chem. *436*, 88 (1924).

[5] P. C. JOHNSON and A. ROBERTSON, J. chem. Soc. *1950*, 2381.

Nucleoside Decomposition by Bacterial Cells

Partially purified nucleosidases extracted from microbial cells have been described by several investigators[1]. Two modes of action have been postulated: phosphorolysis[2] and hydrolysis[3], yielding base and ribose-1-phosphate and base and ribose respectively as the products of nucleoside decomposition.

In the present study, an attempt was made to confirm these findings with living bacteria by comparing the rates of breakdown of ribose, barium ribose-1-phosphate, barium ribose-5-phosphate, 3 ribosides and their free bases by resting cells of *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, and *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. Ribose-5-phosphate was included because its formation from ribose-1-phosphate has been reported by ABRAMS and KLENOW[4]. The substrates were added in 0·5 micromole quantities and exposed to bacterial action at 37°C and pH 7 for 15 min in the presence of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). The amount of TTC reduced to red formazan was used as a measure of terminal respiratory changes instead of the more commonly employed determinations of oxygen uptake or methylene blue reduction. The method has been described elsewhere[5]. The values presented in the accompanying Table are adjusted for endogenous reducing activity. The latter was not increased in the presence of the free bases tested.

Substrate	Amount of TTC reduced in γ		
	E. coli	*P. vulgaris*	*M. pyogenes* var. *aureus*
Ribose	37	21	199
Ba ribose-1-phosphate	39	31	100
Ba ribose-5-phosphate	19	19	38
Adenosine	112	235	173
Guanosine	136	155	114
Uridine	90	145	266

While differences in the rates of decomposition of nucleosides are presumably due to the specificity of the enzymes involved, the discrepancy in the rates of breakdown of ribose and its phosphoric esters, on the one hand, and ribosides, on the other, cannot be explained on this basis. It was observed with 12 more bacterial species tested. The only apparent exception was the strain of *M. pyogenes* listed. However, this organism could be shown to be a vigorous ribose fermenter but weak phosphatase producer.

ROTHSTEIN and MEIER[6] postulated that yeast cell walls were impermeable to phosphoric esters. The uptake of such compounds by yeast was almost completely inhibited in the presence of sodium molybdate, which inactivated cell surface phosphatases. With the 3 organisms under study, no change in the amount of TTC reduced was observed when 2×10^{-4} M sodium molybdate was added to reaction mixtures of bacteria, TTC, and ribose phosphates. In view of the results reported, the sequence of events in the metabolic breakdown of nucleosides by living bacterial cells would seem to require further clarification.

P. H. KOPPER

Department of Microbiology and Public Health, The Chicago Medical School, Chicago 12, Illinois, U.S.A., August 1, 1955.

Zusammenfassung

Ruhende Zellen verschiedener bakterieller Arten zersetzen Nukleoside mit viel grösserer Geschwindigkeit als Ribose und ihre phosphorischen Ester. Phosphatasen der Zellenoberfläche scheinen in den untersuchten Bakterien keine Rolle im Substrattransport in die Zelle zu spielen. Die Stufen im Abbau der Nukleoside durch lebende Bakterien müssen darum noch weiter aufgeklärt werden.

[6] A. ROTHSTEIN and R. MEIER, J. cell. comp. Physiol. *34*, 97 (1949).

Über physiologische, durch einen Gehalt an verschiedenen Alkaloiden charakterisierte Rassen von *Sedum acre* L.

Aus in Kanada gesammelten blühenden Pflanzen von *Sedum acre* L., dem scharfen Mauerpfeffer, hat MARION[1] ein bei 89° schmelzendes Alkaloid der Summenformel $C_{14}H_{21}ON$ isoliert, das dem Schmelzpunkt nach offenbar identisch ist mit dem von KOLESNIKOV und SHVARTSMAN[2] aus der gleichen Pflanze gewonnenen *Sedamin*, für

[1] L. M. PAEGE and F. SCHLENK, Arch. Biochem. Biophys. *40*, 42 (1952). – C. E. CARTER, J. Amer. chem. Soc. *73*, 1508 (1951). – J. O. LAMPEN and T. P. WANG, J. biol. Chem. *198*, 385 (1952). – A. ABRAMS and H. KLENOW, Arch. Biochem. Biophys. *34*, 285 (1951).

[2] L. M. PAEGE and F. SCHLENK, Arch. Biochem. Biophys. *40*, 42 (1952).

[3] C. E. CARTER, J. Amer. chem. Soc. *73*, 1508 (1951). – J. O. LAMPEN and T. P. WANG, J. biol. Chem. *198*, 385 (1952).

[4] A. ABRAMS and H. KLENOW, Arch. Biochem. Biophys. *34*, 285 (1951).

[5] P. H. KOPPER, J. Bact. *63*, 639 (1952).

[1] L. MARION, Canad. J. Res. [B] *23*, 165 (1945); Chem. Abstr. *40*, 1843 (1946).

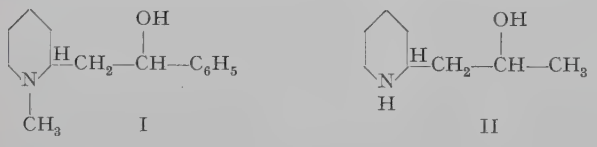
[2] D. G. KOLESNIKOV and A. G. SHVARTSMAN, J. gen. Chem. (USSR) *9*, 2156 (1939), zitiert nach: Chem. Abstr. *34*, 4072 (1940); Chem. Zbl. *1940*, I, 3113. Die dort angegebene, wegen der geraden

das die Autoren den Schmelzpunkt 86–87° und $[\alpha]_D^{20} = -56{,}8°$ angeben. Durch Vergleich des UR.-Spektrums dieses Alkaloids mit dem eines synthetisch erhaltenen, bei 88° schmelzenden Razemats des 1-Methyl-2-(β-oxy-β-phenyl-äthyl)-piperidins (I) wurde die Konstitution des Sedamins aufgeklärt[3].

Da wir im Rahmen unserer Synthesen unter zellmöglichen Bedingungen auch das I entsprechende Keton dargestellt, zu den beiden theoretisch möglichen stereoisomeren Razematen der Konstitution I reduziert, diese in die optischen Antipoden gespalten[4] und deren absolute Konfiguration bestimmt haben[5], interessierte uns der unmittelbare Vergleich unserer synthetischen optisch aktiven Basen mit dem Sedamin von Marion, das wir zu diesem Zweck aus im Juni/Juli bei Darmstadt gesammelten blühenden Pflanzen von *Sedum acre* zu isolieren versuchten.

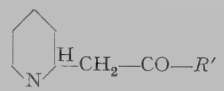
Dabei erhielten wir jedoch aus der frischen blühenden Pflanze in einer Ausbeute von 0,0044%, bezogen auf das Frischgewicht (entsprechend 0,03%, bezogen auf die getrocknete Pflanze), an Stelle des erwarteten Sedamins ein neues, schön kristallisiertes, im Vakuum leicht sublimierbares, bei 83–84° schmelzendes Alkaloid der Summenformel $C_8H_{17}ON$, das in 1,14%iger äthanolischer Lösung $[\alpha]_D^{21} = +29{,}3°$ zeigte. Das Hydrochlorid schmolz bei 141° (Sintern ab 138°; aus Methyläthylketon), das Pikrat bei 154–155° (aus Wasser). Die Base ist weiter durch die quantitative Bildung eines Phenylthioharnstoffs der Summenformel $C_{15}H_{22}ON_2S$ vom Schmelzpunkt 118–119° beim Stehenlassen mit Phenylsenföl in Äther als sekundäres Amin charakterisiert.

Es lag nahe, für diese Base, die durch Chromsäure in Eisessig leicht oxydiert wurde (Smp. des krist. Pikrats des optisch aktiven, noch nicht näher untersuchten Oxydationsprodukts 129–131°), die dem Sedamin analoge Konstitution II eines 2-(β-Oxy-propyl)-piperidins, das heisst eines der beiden stereoisomeren Reduktionsprodukte des Isopelletierins (IV)[6] anzunehmen.



I

II



III $R = CH_3$, $R' = C_6H_5$
IV $R = H$, $R' = CH_3$

Von einer Verbindung II sind ebenso wie von I zwei diastereoisomere Razemate möglich, die in unserem Laboratorium beide dargestellt wurden[7]. Das eine Razemat («Razemat I») schmilzt bei 72–75°, das andere («Razemat II») bei 68–70°. Da die Spaltung dieser Razemate und ihrer N-Benzyl-Verbindungen in die optischen Antipoden noch nicht gelang, haben wir den Vergleich des neuen Alkaloids, das wir als Sedridin bezeichnen, mit den Razematen der Formel II in der Weise durchgeführt, dass wir die UR.-Spektren in Kohlenstofftetrachlorid verglichen, die bei den Stereoisomeren charakteristische Unterschiede aufweisen. Der Vergleich ergab durch die Übereinstimmung der Kurven in allen Einzelheiten eindeutig, dass das neue Alkaloid die rechtsdrehende Form des bei 72–75° schmelzenden «Razemats I» der Konstitution II ist.

Eine Verbindung dieser Konstitution, die in 10%iger äthanolischer Lösung $[\alpha]_D = +22{,}5°$ zeigt, bei 84–86° schmilzt und ein Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 141–142° bildet, ist von Löffler und Tschunke[8] vom Conhydrin ausgehend dargestellt worden. Wir halten es für äusserst wahrscheinlich, dass diese Base mit dem Sedridin identisch ist.

Sedamin haben wir in unserem Pflanzenmaterial ebenso wenig wie Nikotin[1] aufgefunden. Die mit einer automatischen 200stufigen Apparatur zur fraktionierten Gegenstromverteilung[9] aufgenommene Verteilungskurve der Rohbasen-Hydrochloride im System Chloroform/wässrige Natriumchloridlösung ergab nur ein starkes Maximum der neuen Base. An den Stellen, an denen die Verbindungen der Konstitution I und Nikotin hätten auftreten müssen, waren keine Maxima erkennbar.

Das Ergebnis unserer Untersuchung ist, dass in dem bei Darmstadt gesammelten *Sedum acre* das Sedamin der in Kanada gewachsenen Pflanze durch ein anderes, allerdings konstitutionell verwandtes Alkaloid ersetzt ist. *Sedum acre* bildet demnach offenbar zwei physiologische, durch ihren Gehalt an verschiedenen Alkaloiden charakterisierte Rassen. Die Vorstufen des Sedamins und des Sedridins in der Zelle dürften die Ketone der Formel III und IV (Isopelletierin) sein, Verbindungen, die durch Zusammentreffen von dem als Abbauprodukt des Lysins zellmöglichen Δ^1-Piperidein bzw. seiner N-Methyl-Verbindung mit Benzoyl- und Azetessigsäure entstehen können in einer Reaktion, von der wir erstmalig nachgewiesen haben, dass sie unter zellmöglichen Bedingungen unter gekoppelter Decarboxylierung spontan verläuft[6]. Im Lichte dieser Theorie der Biogenese der Alkaloide I und II würde unser Befund bedeuten, dass in einer Rasse von *Sedum acre* L. Benzoylessigsäure, in einer anderen statt dessen Azetessigsäure in den Zellen offenbar im Überschuss produziert wird, in denen die Alkaloide sich bilden.

Wir danken der *Research Corporation*, New York, für die Förderung der vorstehenden Arbeit und Herrn Prof. von Stosch für seine Hilfe bei der Bestimmung des Pflanzenmaterials. Die vorläufige Veröffentlichung der vorstehenden Ergebnisse erfolgt, weil Herr Dr. H. C. Beyerman, Delft, uns freundlicherweise mitteilte, dass er in gleicher Richtung arbeitet.

C. Schöpf und R. Unger

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule, Darmstadt, den 11. Oktober 1955.

Summary

It is shown that *Sedum acre* L. collected near Darmstadt contains an alkaloid Sedridin $C_8H_{17}ON$, while in the literature a sample of the plant collected in Canada showed a content of Sedamin ($C_{14}H_{21}ON$) and Nicotine. The constitution of Sedridin has been proved and its biogenesis is discussed.

Anzahl der Wasserstoffatome sicher falsche Summenformel $C_{17}H_{24}O_2N$ wird offenbar von den Autoren selbst für fraglich gehalten. Die von A. Nordal [vgl. Chem. Zbl. *1944*, II, 224; Chem. Abstr. *44*, 3216 (1950); *45*, 2823, 5771 (1951)] als Sedin und Sedacrin bezeichneten öligen Basen dürften kaum einheitliche Verbindungen sein.

[3] L. Marion, R. Lavigne und L. Lemay, Canad. J. Chem. *29*, 347 (1951); Chem. Abstr. *46*, 8128 (1952).

[4] G. Dummer, Diss. TH Darmstadt 1954.

[5] G. Dummer, Diss. TH Darmstadt 1954. – W. Wüst, Diplomarbeit TH Darmstadt 1955.

[6] Dieses wurde aus Δ^1-Piperidein und Azetessigsäure unter zellmöglichen Bedingungen erhalten; vgl. Angew. Chem. *61*, 31 (1949).

[7] R. Walbe, Diss. TH Darmstadt 1955.

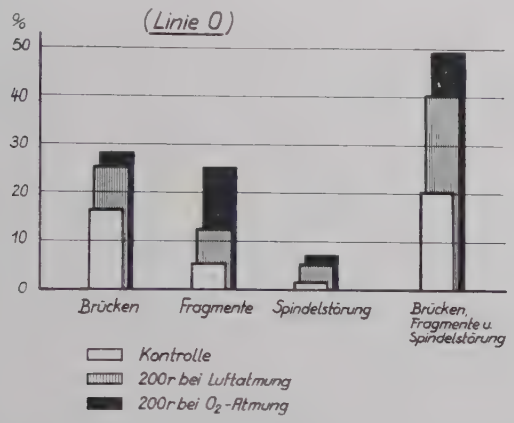
[8] K. Löffler und R. Tschunke, Ber. dtsch. chem. Ges. *42*, 929 (1909).

[9] F. A. v. Metzsch, Chem.-Ing. Technik *25*, 66 (1953).

Chromosomenaberrationen in Tumorasziteszellen des Ehrlich-Karzinoms der Maus nach Röntgenbestrahlung *in vivo* bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrucken

Solide Tumoren des Ehrlich-Karzinoms der Maus können in ihrem weiteren Wachstum gehemmt werden, wenn man sie der Einwirkung von Röntgenstrahlen aussetzt. Die Wachstumshemmung lässt sich verstärken, wenn die Versuchstiere während der Bestrahlung reinen Sauerstoff, möglichst unter Überdruck, einatmen[1].

24 h nach einer homogenen Röntgenganzbestrahlung von Tumoraszites-Mäusen mit einer Dosis von 200 r finden sich in den Karzinomzellen des Tumoraszites häufiger Chromosomenaberrationen, und zwar Mitosezellen mit Chromosomenbrücken, Chromosomenfragmenten oder Spindelstörungen, als bei der unbestrahlten Kontrolle.



Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Mitosezellen (späte Ana- und frühe Telophase) beim Ehrlich-Karzinom-Ascites ohne und nach Röntgenbestrahlung (200 r) bei Luft- und bei Sauerstoffatmung (2 at).

Am 7. Tag nach der Impfung bei Luftatmung mit einer Dosis von 200 r (3 mm Al, 200 kV, 20 mA, FHA 20 cm, Dosisleistung 420 r/min) bestrahlte Versuchstiere wurden 24 h später getötet. In Karzinomzellen der späten Anaphase und der frühen Telophase fanden sich relativ weniger Chromosomenaberrationen als in Asziten, die bei Sauerstoffatmung (1 atü) jedoch unter sonst gleichen Bedingungen bestrahlt und 24 h später ausgewertet worden waren (Abb. 1). Die Prozentsätze beziehen sich auf insgesamt 414 Ana- und Telophasezellen der unbestrahlten Kontrolle, auf 275 der bei Luftatmung und auf insgesamt 334 Ana- und Telophasezellen der bei Sauerstoffatmung röntgenbestrahlten Asziten. Der gefundene Unterschied ist für die Fragmentzellen statistisch gut gesichert[2].

Bei einer anderen, weniger strahlenempfindlichen Linie des Ehrlich-Karzinoms, die durch passageweise Röntgenbestrahlung erhalten worden war[3], war der Sauerstoffeffekt weniger deutlich. In der unbestrahlten Kontrolle fanden sich insgesamt mehr Brückenzellen.

W. Bösenberg, W. Dittrich, H. Heinrich, R. Hüllemann und U. Lange

Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf, den 1. September 1955.

Summary

The frequency of radio-induced fragments of chromosomes increases in ascites-cells of the Ehrlich-carcinoma at higher oxygen partial pressure, to which test animals are exposed during irradiation.

[1] W. Dittrich und H. Stuhlmann, Naturwissenschaften *41*, H. 5, 122 (1954).

[2] S. Koller, *Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen*, 2 Aufl. (Dresden und Leipzig 1943).

[3] W. Dittrich und G. Uhlmann, Naturwissenschaften *41*, H. 5, (1954). – G. Schubert, Strahlenther. *88*, 2, 308 (1952); *90*, 1 (1953); Z. Krebsforsch. *60*, 216 (1954).

Über den biologischen Abbau eines Glutarsäureimids[1,2]

In früheren Arbeiten wurde eingehend über die Darstellung verschiedener Glutarsäureimide berichtet[3]. Von den beschriebenen Verbindungen hat sich das α-Phenyl-α-äthyl-glutarsäureimid (I) auf Grund eingehender pharmakologischer und klinischer Prüfung[4] als mild wirkendes Schlafmittel erwiesen, das inzwischen unter der geschützten Marke «Doriden»[5] in den Handel gekommen ist.

Die Frage nach dem Schicksal dieser Verbindung im Organismus und die Tatsache, dass auch andere verschieden substituierte Glutarsäureimide in letzter Zeit therapeutisches Interesse aufweisen, gaben uns den Anlass, den Stoffwechsel von Glutarimidderivaten eingehend zu studieren. Im Prinzip wurden zwei Wege zur Abklärung des Problems eingeschlagen. Mit C^{14} markierte Verbindungen wurden synthetisiert[6], um die Abwandlung und Verteilung dieser Stoffe im tierischen Körper in qualitativer und hauptsächlich in quantitativer Hinsicht mit Hilfe der Tracer-Technik zu verfolgen[7]. Anderseits wurde eine Reihe von Verfütterungsversuchen mit relativ hohen Dosen (im Durchschnitt 200 mg/kg) von verschiedenen Glutarimid-Derivaten an Hunden durchgeführt[8], um die Isolierung der Ausscheidungsprodukte in Mengen, die für Analyse und Strukturaufklärung ausreichend sind, zu ermöglichen.

In der vorliegenden Mitteilung wollen wir über die Resultate der zuletzt genannten Versuche berichten.

[1] 14. Mitteilung über Alkylenimin-Derivate. 13. Mitteilung vgl. E. Sury und K. Hoffmann, Helv. chim. Acta *38*, 728 (1955).

[2] Auszugsweise vorgetragen von K. Hoffmann am 3. Congrès International de Biochimie, Bruxelles, 1.–6. August 1955.

[3] E. Tagmann, E. Sury und K. Hoffmann, Helv. chim. Acta *35* 1235, 1541 (1952). – E. Urech, E. Tagmann, E. Sury und K. Hoffmann, Helv. chim. Acta *36*, 1809 (1953).

[4] F. Gross, J. Tripod und R. Meier, Schweiz. med. Wschr. *85*, 305 (1955). – R. Lanz, Praxis (Schw.) *44*, 223 (1955). – P. Müller und F. Rohrer, Schweiz. med. Wschr. *85*, 309 (1955).

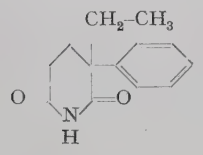
[5] Chemische Kurzbezeichnung: Glutethimid.

[6] Diese Arbeiten sind teilweise durch Herrn Prof. H. Schmid und Mitarbeiter (Chemisches Institut der Universität Zürich) durchgeführt worden, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken möchten. Eine Publikation hierüber wird andernorts erfolgen.

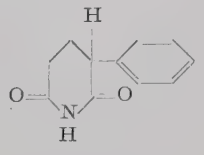
[7] Die biologischen Untersuchungen mit den radioaktiv signierten Verbindungen erfolgen in verdankenswerter Weise durch Herrn Prof. K. Bernhard und Mitarbeiter an der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel. Eine vorläufige Mitteilung erfolgte anlässlich der International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1955.

[8] Wir danken Herrn Dr. F. Gross in unserer biologischen Abteilung für die Durchführung dieser Versuche.

In erster Linie wurden die Ausscheidungsprodukte des bereits in der Therapie eingeführten Doriden (I) untersucht. Während es bekanntlich gelingt, im Harn von zum Beispiel mit Barbituraten behandelten Tieren diese Substanzen teilweise unverändert wiederzufinden, gelang uns der Nachweis von Doriden selbst im Hundeharn bisher in keinem einzigen Fall. Isoliert wurde dagegen eine farblose kristallisierte Verbindung, die bei 143° schmolz. Die UV.- und IR.-Spektren des Abbauproduktes in Kombination mit dem Analysenresultat wiesen auf ein desäthyliertes Derivat hin. Das zum Beweis synthetisch hergestellte α-Phenylglutarimid (II) war in jeder Hinsicht mit dem Abbauprodukt identisch (Mischsmp., UV.- und IR.-Spektrum).

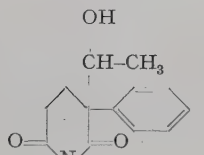


I «Doriden»

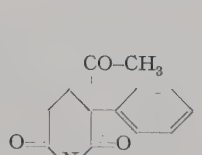


II

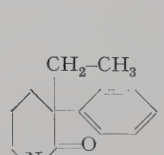
Das α-Phenylglutarimid ist eine ungiftige Verbindung, die keinerlei sedative Eigenschaften mehr besitzt. Die Abspaltung der Äthylkette von Doriden auf biologischem Wege ist ein seltsamer Befund, der keine Parallele in den bisherigen Ergebnissen beim Abbau von Kohlenwasserstoffketten hat. Es können kaum Zweifel darüber bestehen, dass die Äthylkette auf oxydativem Wege entfernt wurde, obwohl die bekannten biologischen Oxydationsmechanismen, wie die sogenannte β-Oxydation und Methyloxydation (ω-Oxydation), im vorliegenden Fall dem biologischen Vorgang nicht zugrunde liegen können. Der wahrscheinlichste Ort des oxydativen Angriffes ist die Methylengruppe der Äthylkette (das ω-1 C-Atom). Der Ablauf der Verbrennung vollzieht sich möglicherweise über die Zwischenstufen III[9] und IV[10].



III



IV



V

Das vermutliche Zwischenprodukt IV kann als unstabil angesehen werden, gelang doch die von uns versuchte Synthese dieser Verbindung nicht. Unter den Reaktionsbedingungen der Synthese wurde die Azetylgruppe eliminiert, und als Endprodukt der Reaktionsfolge entstand das α-Phenylglutarimid II.

[9] Die Zwischenstufe III müsste nicht unbedingt durch eine direkte Hydroxylierung des (ω-1)-C-Atoms entstanden sein. In Anbetracht der Arbeiten von K. Bernhard, U. Gloor und E. Scheitlin [Z. physiol. Chem. *299*, 235 (1955)] liesse sich die Entstehung dieser Verbindung auch nach dem Schema

$$-CH_2-CH_3 \xrightarrow[-2H]{} -CH=CH_2 \xrightarrow[+\,H_2O]{} -CH(OH)-CH_3$$

erklären, das heisst durch Wasseranlagerung nach erfolgter ω, (ω-1)-Dehydrierung der Äthylkette.

[10] Die Verbindung IV könnte entweder direkt (Säurespaltung) in Verbindung II übergehen oder zum α-Phenyl-α-carboxyglutarimid biologisch weiteroxydiert werden, welches als Malonsäure-Derivat die freie Carboxylgruppe durch Kohlensäureabspaltung leicht verlieren würde.

Zur weiteren Abklärung des biologischen Abbaumechanismus von Doriden haben wir den Stoffwechsel eines partiell reduzierten Produktes des letzteren, nämlich des 3-Phenyl-3-äthyl-piperidons-(2) (V), untersucht. Überraschenderweise liess sich aus dem Harn eines mit diesem Piperidonderivat behandelten Hundes α-Phenylglutarimid (II) isolieren, das heisst dasselbe Abbauprodukt wie bei der Verfütterung von Doriden. Mit andern Worten: es wird auch bei dieser Verbindung die Äthylkette eliminiert, wobei aber auch das C5-Atom des Piperidinringes bis zur Oxogruppe oxydiert wird[11]. Die Frage, ob zuerst das Piperidon zum Doriden oxydiert und dann die Äthylkette abgebaut wird oder ob die biologische Reaktionsfolge umgekehrt verläuft, bleibt noch offen.

Stoffwechselversuche mit weiteren Glutarimidabkömmlingen sind im Gange, wobei die Hoffnung besteht, dass das neue Tatsachenmaterial vermehrten Einblick in das biologische Geschehen mit dieser Verbindungsklasse erlauben wird[12].

J. Kebrle und K. Hoffmann

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, den 14. November 1955.

Summary

In view of the therapeutic interest glutarimides have been found recently, the metabolism of α-Phenyl-α-ethyl-glutarimide and 3-Phenyl-3-ethyl-2-piperidone have been studied by feeding experiments upon dogs. Both derivatives were degraded to α-phenyl glutarimide, the ethyl side chain was thereby very probably eliminated by oxidation.

[11] Die Tatsache, dass ein stickstofftragendes C-Atom oxydativ angegriffen wird, ist im Hinblick auf die Befunde von H. Steudel [Z. physiol. Chem. *213*, 11 (1932)], wonach N-Methyl-piperidin im Tierkörper zu δ-Methylamino-valeriansäure aufgespalten wird, nicht ungewöhnlich. Ähnliche oxydative Angriffe werden auch bei der Biogenese von Alkaloiden vermutet [E. Wenkert, Exper. *10*, 346 (1954)].

[12] Der experimentelle Teil über die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der in dieser Mitteilung erwähnten biologischen Abbauprodukte wird in Bälde in den Helvetica Chimica Acta veröffentlicht werden.

Isolation of Crystalline Aldosterone from the Urine of Patients with Congestive Heart Failure[1]

Recently[2] we succeeded in isolating the so-called sodium retaining factor[3] from the urine of a nephrotic child in crystalline form and in identifying it with aldosterone from adrenals. The occurrence of a presumably identical sodium retaining factor has been established since 1950 in the urine of normal persons and especially of patients also with other diseases accompanied generally by low sodium excretion.[4]

[1] Communication No. 137 "On Steroids". No. 136 compare A. Wettstein, Exper. *11*, 465 (1955).

[2] J. A. Luetscher, Jr., R. Neher, and A. Wettstein, Exper. *10*, 456 (1954). – J. A. Luetscher, Jr., A. Dowdy, J. Harvey, R. Neher, and A. Wettstein, J. biol. Chem. *217*, 505 (1955).

[3] A. B. Deming and J. A. Luetscher, Jr., Proc. Soc. exper. Biol. Med. *73*, 171 (1950).

[4] Literature in: R. Neher and A. Wettstein, Acta endocrinol. *18*, 386 (1955).

We have now been able to isolate this sodium retaining factor in crystalline form from the urine of two patients with congestive heart failure. It proved to be identical again with aldosterone.

One of the patients studied, Mrs. L. B., 50 years of age, suffered from chronic congestive heart failure with heavy edema, ascites and hydrothorax. Therapy included bed rest, digitalis, and low sodium diet. No steroids or corticotrophins were given. The total pool of urine originating from collection over a period of 15 days consisted in 6·42 l and contained a total of 9·6 mEq. of sodium and 265 mEq. of potassium. The other patient, Mr. C. G., 53 years of age, suffered from rheumatic heart disease and congestive cardiac failure. He showed mild icterus secondary to congestion of the liver and probably to pulmonary infarction. He was treated with bed rest, digitalis, and low sodium diet, but the cardiac failure did not respond to this treatment. Urine was collected over 6 days. The total volume was 4·44 l, containing a total of 8·9 mEq. of sodium and 162 mEq. of potassium.

Each of these urine pools was acidified to pH 1 and extracted promptly with chloroform as described earlier[2, 4]. These extracts (A) were set aside, and the urine was allowed to stand for 24 h at pH 1, and extracted again. In all subsequent work the second extracts (B) only were used. On paper chromatography in the system propylene glycol/toluene for 6 days, the zone around cortisone was cut out and eluted with 95% ethanol. Paper-chromatographic analysis[4] of a sample of this biologically active eluate (12·5 mg) in Bush's system C and in formamide/chloroform using UV.-absorption, reductive capacity (bluetetrazolium) and soda fluorescence as indicators pointed to the presence of a total amount of about 2·5 mg of aldosterone. The whole eluate was chromatographed preparatively therefore on 7 paper sheets (Whatman No. 1, washed) in Bush's system C and the UV.-absorbing band corresponding to aldosterone eluted in the usual manner. It yielded 2·8 mg of an amorphous residue which crystallized from ether–aceton–water upon inoculation with aldosterone.

The crystals (1·25 mg) showed the same melting point as authentic aldosterone (110°/163°C) and gave no melting point depression in mixture with the latter. For final identification the IR.-spectra[5] (in $CHCl_3$-solution) were compared and proved to be identical.

In these two cases the mean output of aldosterone was at least as high as 130 μg/24 h.

Now that the identity of the sodium retaining factor from urine with aldosterone is established unequivocally in 3 cases, there is no doubt that the substance with the same chromatographic and biological properties demonstrated in other urines consists also of aldosterone.

J. A. Luetscher, Jr., R. Neher, and A. Wettstein

Stanford University School of Medicine, San Francisco, California; Research Laboratories of CIBA Limited, Basle, Switzerland, November 1st, 1955.

Zusammenfassung

Der Natrium-retinierende Faktor aus dem Urin zweier Patienten mit Stauungs-Herzfehlern wurde in kristallisierter Form isoliert und mit Aldosteron identifiziert.

[5] Our thanks are due to Dr. A. Ganz, Basle, for these determinations.

Effets de l'irradiation sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs dérivés acidosolubles chez le rat

On a montré que les radiations ionisantes diminuent la quantité d'acides nucléiques dans les tissus. Ce phénomène est très marqué dans le cas de l'acide désoxyribonucléique (ADN) tandis que dans celui de l'acide ribonucléique (ARN), il est beaucoup moins prononcé; on a même observé parfois une augmentation de la synthèse de cet acide après irradiation (Hevesy[1], Holmes[2], Abrams[3], Kelly[4]). Les recherches de Kanazir[5] sur les effets des radiations ultraviolettes sur les bactéries ont démontré que la synthèse de l'ADN est bloquée pendant un certain temps et qu'à la suite de ce blocage, il se produit une accumulation de substances acidosolubles, qui sont probablement des précurseurs de cet acide. Nous avons voulu rechercher si l'action des radiations X provoque le même effet dans la rate du rat.

Nous avons travaillé sur des rats mâles de 95–110 g avec une dose de 1500 r. L'irradiation a été faite avec un appareil de Roentgen-thérapie profonde: 220 kV, 12 mA, 0,5 Cu (90 r/min). Nous avons irradié deux animaux à la fois dans une boîte de bois perforée. 2½ h et 24 h après l'irradiation, nous avons sacrifié les animaux par décapitation; après avoir laissé le sang s'écouler, nous avons prélevé la rate immédiatement et nous l'avons lavée avec une solution physiologique refroidie. Nous avons ensuite lavé la rate découpée en petits morceaux à l'alcool, puis deux fois à l'alcool-éther (3:1) pendant 20 min. Le tissu a ensuite été séché sous vide et nous avons ramené tous les résultats au poids sec. Le tissu séché était alors extrait à 3 reprises par de l'acide perchlorique 2% pendant 30 min. Toutes ces opérations étaient effectuées à 2–4° C. Sur un aliquot de cette fraction acidosoluble, l'absorption à 260 mμ a été mesurée. Nous avons ensuite déterminé le phosphate organique et inorganique par la méthode d'Allen[6], ainsi que le ribose et le désoxyribose. Le tissu restant a été traité à deux reprises par de l'acide perchlorique à 5% pendant ½ h à 100°C et deux fois avec le même acide à 2%. Nous avons déterminée l'ARN et l'ADN dans cet extrait par la méthode à l'orcinol[7] et par celle de Ceriotti[8], respectivement.

Résultats et discussion. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau, et dans les Figures 1, 2 et 3, où les valeurs ont été exprimées en pourcent de celles obtenues pour les animaux témoins.

Le Tableau et les Diagrammes indiquent une diminution précoce de l'absorption UV. dans la fraction acidosoluble: il n'y a donc pas d'accumulation de bases azotées dans cette fraction (Fig. 1). Le phosphore organique subit une diminution, sans retour à la normale après 24 h (Fig. 2). Le phosphore inorganique augmente rapidement pour se maintenir, pendant 24 h, au-dessus de la normale (Fig. 3).

Le désoxyribose acidosoluble commence par diminuer, pour augmenter ensuite au delà de la normale. Une petite augmentation s'observe également dans le cas du ribose acidosoluble, qui diminue ensuite au dessous de la normale après 24 h.

[1] H. Hevesy, Adv. Enzymol. *7*, 3 (1947).
[2] B. E. Holmes, Brit. J. Radiol. [N.S.] *22*, 487 (1949).
[3] H. Abrams, Arch. Biochem. Biophys. *30*, 90 (1951).
[4] L. Kelly et H. B. Jones, Proc. Soc. exper. Biol. *74*, 493 (1950).
[5] D. Kanazir, Thèse, Bruxelles 1955.
[6] R. J. Allen, Biochem. J. *34*, 858 (1940).
[7] W. Mejbaum, Z. physiol. Chem. *198*, 297 (1952).
[8] G. Ceriotti, J. biol. Chem. *198*, 297 (1952).

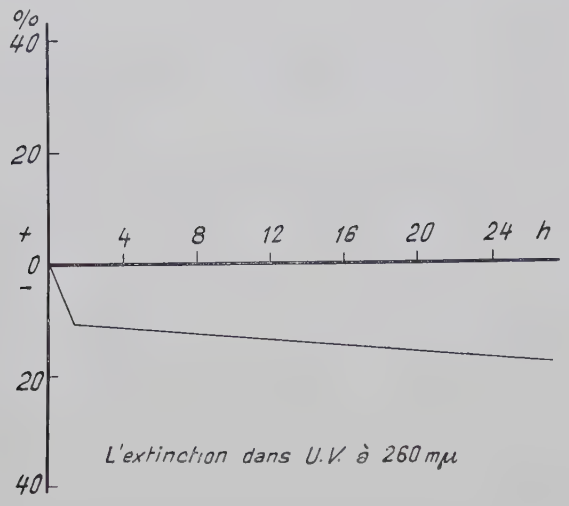


Fig. 1.

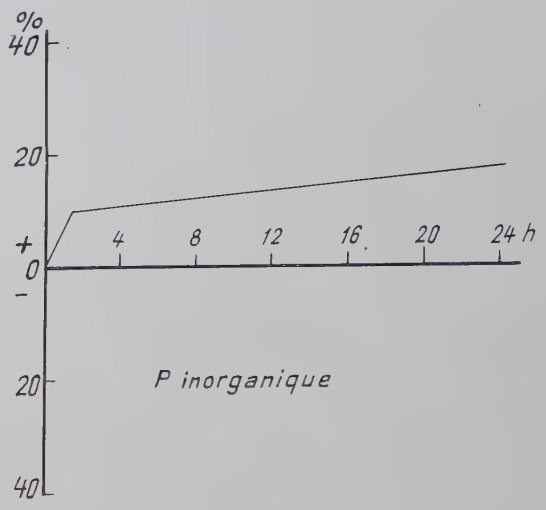


Fig. 3.

L'évolution de l'ADN et de l'ARN montre une chute qui atteint, en 24 h, 43% de la valeur normale pour l'ADN et 33% pour l'ARN.

		non irradié	irradié 2½ h *a, b*	P *c*	irradié 24 h	P *c*
Fraction acidosoluble	U.V. . . .	0,265	0,224	< 0,001	0,221	< 0,001
	Cerіotti .	0,064	0,055	< 0,001	0,119	< 0,001
	Orcinol . .	0,296	0,310	< 0,15	0,199	< 0,001
	Phosphate inorganique	0,072	0,078	< 0,001	0,083	< 0,001
	Phosphate organique .	0,096	0,091	< 0,15	0,086	< 0,001
ADN		0,184	0,150	< 0,001	0,104	< 0,001
ARN		0,165	0,121	< 0,005	0,111	< 0,001

a Les résultats représentent l'extinction à 260 mμ divisée par le poids sec de tissu en mg.

b Les chiffres représentent la moyenne de 18 expériences pour les témoins, de 17 pour les animaux irradiés 2½ h et de 13 expériences pour les animaux irradiés 24 h.

c P < 0,05 signifie que la différence entre les moyennes des contrôles et des traités est significative.

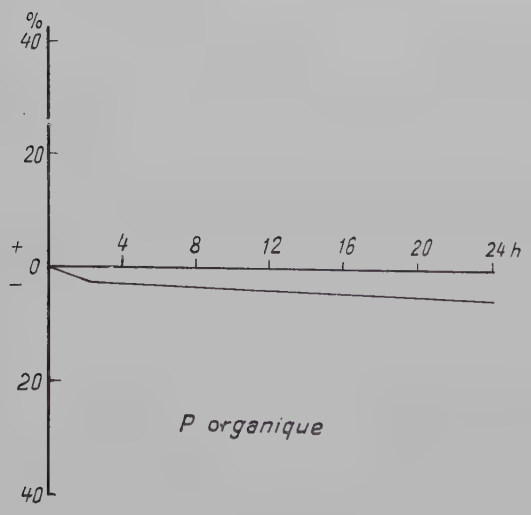


Fig. 2.

Conclusions. L'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN dans la rate de rats ayant subi une irradiation X ne s'accompagne pas d'une augmentation de la teneur de la fraction acidosoluble de cet organe en dérivés nucléiques de faible poids moléculaire (mononucléotides, nucléosides, bases azotées).

Comme la quantité des acides nucléiques diminue par rapport au poids sec des organs, on doit supposer que les acides nucléiques sont dégradés et que l'organe est capable d'éliminer les produits de cette dégradation[9]. Une telle élimination expliquerait également l'appauvrissement de la fraction acidosoluble en dérivés puriques et pyrimidiques. Elle pourrait peut-être résulter d'altération des membranes cellulaires.

A. Bećarević, K. Kaćanski, D. Mančić et Ljiljana Hadžić.

Laboratoire de Radiobiologie de l'Institut des Sciences nucléaires «Boris Kidric» de Belgrade, le 19 octobre 1955.

Summary

In the rat, X-irradiation leads to a decrease of the net RNA and DNA content of the spleen, without, however, increasing the low molecular weight nucleic acid derivatives in the acid-soluble fractions of the same tissue. It is suggested that an alteration of the cell membranes could account for the apparent elimination of these nucleic acid degradation products which should normally appear in the acid-soluble fraction.

[9] A. Kelner, W. D. Bellamy, G. E. Stapleton et M. R. Zelle, Bacteriol. Rev. *19*, 22 (1955).

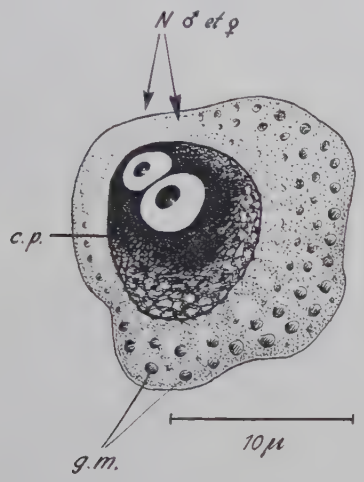
Activation concomitante par l'hétéroauxine de la résorption du corps paranucléaire ribonucléique et de la germination des zygotes chez *Allomyces*

L'émission du premier tube de germination – futur système rhizoïde – par le zygote d'*Allomyces* est précédée et conditionnée par la dissociation du «nuclear cap»[1].

[1] W. R. Hatch, Ann. Bot. [N.S.]*2*, 583 (1938).

Nous avons récemment démontré, par la méthode cytochimique, que ce corps paranucléaire est une formation basophile cytoplasmique essentiellement constituée d'acide ribonucléique[2], accompagnée de protéines réagissant faiblement au test sulfhydrile[3].

Ces précisions d'ordre cytochimique, envisagées à la lumière des travaux de BRACHET[4] et de CASPERSSON[5] sur la relation acide ribonucléique – synthèse protéique, permettent de mieux comprendre l'importance de la dissolution préalable du corps paranucléaire lors de la germination des zygotes d'*Allomyces*. Le processus de dissolution débute à la périphérie de l'organite, de telle sorte que l'intensité de la basophilie – observée par coloration au bleu de toluidine $^1/_{10000}$ à pH 3,5 – s'amenuise progressivement en direction des noyaux mâles et femelles (voir figure) qui ne tardent d'ailleurs pas à fusionner. Cette chute de la basophilie cytoplasmique est corrélative d'un accroissement du volume du zygote précédant l'émission du tube germinatif.



Stade prégerminatoire du zygote d'*Allomyces javanicus*. Début de «résorption centripète» du corps paranucléaire (*c. p.*); granules métachromatiques (*g. m.*) et noyaux sexuels (N). Fixation alcool absolu – coloration bleu de toluidine.

Il nous a paru intéressant de rechercher si des agents chimiques exerçant une activité biologique chez les végétaux seraient susceptibles d'activer, sinon d'amorcer, ces phénomènes de réajustement cytoplasmique (rejuvénescence). Nous avons trouvé que l'hétéroauxine provoque une nette accélération de la vitesse de germination des zygotes d'*Allomyces*. Le délai séparant la plasmogamie gamétique des premiers signes de la résorption du corps paranucléaire unique entourant les noyaux sexuels en voie de fusion en est diminué d'autant.

Voici, en bref, notre méthode d'étude et nos premiers résultats: Un fragment (env. 10 mm²) de gamétophyte pur d'*Allomyces javanicus* KNIEP, cultivé 10–15 jours sur milieu amidon-extrait de levure[6], a été plongé pendant 2½ h dans une solution saline diluée (sol. DS de MACHLIS[7]). Ce délai permet la libération (env. 2 h) et la copulation (env. ½ h) des gamètes. La suspension de zygotes (et de gamètes résiduels) est alors pipettée (chaque fois 1,25 cm³) dans une série de tubes à essais (lavés à l'acide puis soigneusement rincés et séchés) contenant 2,5 cm³ de solution glucosée à 1% et enrichie ou non (tubes témoins) en β-indolylacétate de K (IAK). Le volume de la suspension de zygotes est complété dans tous les cas à 5 cm³, avec de l'eau distillée. Dans un tel volume de liquide, les zygotes (= planozygotes) continuent à nager activement pendant 1–2 h. C'est après 2 h que nous avons prélevé 3 gouttes de suspension dans chaque tube, gouttes que nous avons réparties sur 3 lames propres (lavées à l'acide puis à l'eau distillée et séchées) placées en chambre humide (boîtes de Pétri avec papier filtre saturé d'eau distillée). Le dénombrement des zygotes germés par rapport au nombre total de zygotes (env. 100 par goutte) a été effectué après 2 et 3 h d'incubation, en prospectant systématiquement le volume de la goutte étalée sous une lamelle.

Voici nos premiers résultats. Les différences observées dans la vitesse de germination des zygotes sont suffisamment significatives pour nous dispenser d'une analyse statistique:

	% germination zygotes (critère: tube germinatif) 2 h après	3 h
Témoins	22	51
IAK 1 mg/l (10^{-6}) . . .	34	66
IAK 10 mg/l (10^{-5}) . . .	52	88
IAK 100 mg/l (10^{-4}) . . .	2	15

Il ressort de l'examen de ces résultats que la dose de 10 mg par l de IAK est la plus favorable à la stimulation de la germination des zygotes d'*Allomyces javanicus*. A cette concentration, les premiers zygotes commencent déjà à pousser leur tube germinatif après 1 h d'incubation en chambre humide.

Toutes les préparations ayant servi aux opérations de dénombrement ont été fixées au mélange alcool – formol 10% (1:1) et colorées 5 min au bleu de toluidine (pH 3,5 pour restreindre l'interférence protéique[8]). Nous avons ainsi pu vérifier la correspondance entre l'activation de la germination des zygotes et la résorption du corps paranucléaire ribonucléique dans les cellules traitées à l'hétéroauxine.

Notre récente mise en évidence de la phosphatase alcaline (méthode cytochimique de GOMORI[9], selon GLICK[10]) – enzyme intimément lié au métabolisme des acides nucléiques[11] – principalement au niveau du cytoplasme granulaire entourant le corps paranucléaire d'*Allomyces*[12], contribue à éclairer, du même coup:

1° le fait, mentionné plus haut, de la «résorption centripète» du corps paranucléaire durant la phase de l'activation prégerminatoire; et

2° la relation postulée entre l'action stimulante de l'hétéroauxine et le réveil du système dynamique acide ribonucléique-protéines (au sens de BRACHET et CASPERSSON déjà cités). Une telle relation peut être figurée par le schéma hypothétique suivant. Il coordonne, sur la base de nos nouvelles observations chez *Allomyces*,

[2] G. TURIAN, C. r. Acad. Sci. *240*, 2343 (1955).

[3] G. TURIAN, Protoplasma (à paraître).

[4] J. BRACHET, *Embryologie chimique* (Masson & Cie, Paris 1944); Symp. Soc. exper. Biol. *1*, 207 (1947); Nature *174*, 876 (1954).

[5] T. O. CASPERSSON, *Cell growth and cell function* (W. W. Norton & Co., New York 1950).

[6] R. EMERSON et D. L. FOX, Proc. roy. Soc. London [B] *128*, 275 (1940).

[7] L. MACHLIS, Amer. J. Bot. *40*, 89 (1953).

[8] H. E. WADE et D. M. MORGAN, Nature *174*, 920 (1954).

[9] G. GOMORI, Proc. Soc. exper. Biol. N. Y. *42*, 23 (1939).

[10] D. GLICK, *Techniques of histo- and cyto-chemistry* (Interscience, New York 1949).

[11] J. R. G. BRADFIELD, Biol. Rev. *25*, 113 (1950). – J. F. DANIELLI, *Cytochemistry* (J. Wiley & Sons, Inc., New York 1953).

[12] G. TURIAN, Résultats inédits (1955).

quelques-unes des données fondamentales de la cytophysiologie:

Hétéroauxine { phosphatases / acide ribonucléique → synthèse protéique
Activateur — Système activé

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à M. le Prof. F. Chodat, tant pour ses judicieux conseils que pour les facilités de travail qu'il nous offre dans son laboratoire.

G. Turian

Institut de Botanique générale, Université de Genève, le 31 octobre 1955.

Summary

Heteroauxin (optimal concentration 10^{-5}) activates the germination of the zygotes and the dissolution of their RNA nuclear cap in *Allomyces javanicus*.

Alkaline phosphatase has been located cytochemically in the cytoplasm surrounding the RNA nuclear cap.

These new observations lead the author to postulate a relationship between the stimulating action of heteroauxin, activation of the phosphatases and awakening of the RNA-protein synthesis dynamic system during the germination of the zygotes in *Allomyces*.

Effect of Inanition and Adrenalectomy on the Electrophoretic Patterns of Soluble Lymphatic Tissue Proteins

In view of the remarkable modifications undergone by lymphatic tissue in some experimental conditions, the increase in weight and in lymphocyte number after adrenalectomy, and the marked loss of weight and of lymphocytes during fasting (see Dougherty[1]), it seemed interesting to ascertain if these morphological and functional changes were accompanied by modifications in the electrophoretic patterns of soluble cell proteins.

Experimental.—Male albino rats of the *Italico* strain bred in this Department, weighing 120—130 g and fed a standard diet (Randoin and Causeret[2]) were used throughout. They were divided into three groups: normals: 5 pools with a total of 22 rats; adrenalectomized: 5 pools with a total of 19 rats; fasted: 3 pools with a total of 18 rats.

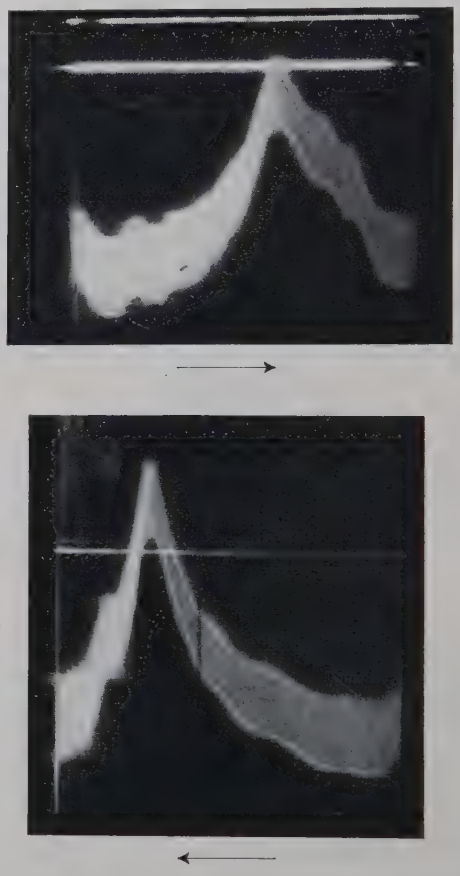
Adrenalectomy was performed by the dorsal approach under light ether anaesthesia, and after the operation rats were given 1% NaCl solution to drink. If NaCl was withdrawn, the great majority of the adrenalectomized animals died in a few days. The weight decrease during 4 days of fasting was, on the average, 26%.

The animals were killed 4 days after the adrenalectomy or after 4 days of fast. Immediately lymphatic tissue was carefully dissected free of connective tissue and fat and kept at ice temperature during the collection of the rest of the tissue.

As representative of lymphatic tissue, the following organs were taken: 6 neck lymph nodes, 4 axillary ones, 4 inguinal ones, the whole mesenteric chain and the thymus.

Tissues from 3—6 rats, according to the experimental conditions, were pooled, weighed and dispersed in diethyl-barbiturate buffer (pH 8·6, μ 0·1) with a glass homogenizer (Potter and Elvehjem[3]) kept in cracked ice. Dilution of the dispersion was 1: 2·5. The tissue suspension was then centrifuged in the cold room for 15 min at 21,000 g in a Servall type SS-1 centrifuge.

The supernatant was carefully decanted and centrifuged again at 21,000 g for 1 h. The clear supernatant was then dialyzed for 16 h at 2° against 1 l of diethyl-barbiturate buffer. The electrophoresis was performed on the dialyzed fluid (centrifuged again if necessary) with the apparatus of Tiselius (Perkin-Elmer, Model 38) in a 2 ml rectangular cell. Time of electrophoresis was 5,400 s, with a current of 10 mA.



Electrophoretic pattern of soluble proteins of lymphatic tissue. *a* Ascending limb; *b* descending limb.

Relative protein concentration was determined on photographic diagrams obtained with the scanning method of Longsworth[4]. Enlarged patterns of the ascending cell limb were used. The conductivity of buffer and protein solutions was measured with a Wheatstone bridge (Leeds and Northrup).

Total nitrogen of the protein solutions was determined by the micro-Kjeldahl method.

Results. The electrophoretic pattern of soluble lymphatic tissue proteins was similar in all the analyses performed.

Very early in the electrophoretic run two small components appeared which rapidly traversed the cell and disappeared before the other slower components

[1] T. F. Dougherty, Physiol. Rev. *32*, 379 (1952).

[2] L. Randoin and J. Causeret, Bull. Soc. Sci. Hyg. Aliment. Paris *14*, 1 (1947).

[3] V. R. Potter and C. A. Elvehjem, J. biol. Chem. *114*, 495 (1936).

[4] L. G. Longsworth, J. Amer. chem. Soc. *61*, 529 (1939).

Table I. — Relative percentage of the electrophoretic components of soluble proteins of lymphatic tissue in normal, adrenalectomized and fasted rats (means ± S.E.M.).

Condition	Pools analyzed n.	Electrophoretic components					
		a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
Normals	5	2·39 ± 0·17	13·11 ± 1·08	63·25 ± 2·19	11·89 ± 1·66	5·73 ± 0·52	4·06 ± 1·34
Adrenalectomized . . .	5	1·78 ± 0·14*	8·97 ± 0·81*	67·14 ± 1·55	11·13 ± 0·57	6·73 ± 1·03	2·49 ± 1·50
Fasted for 96 h.	3	1·70 ± 0·26	11·43 ± 0·27	62·66 ± 2·15	16·40 ± 0·52	5·97 ± 1·12	3·20 ± 1·01

* Differences with normals statistically significant ($P < 0.05$; Student's test).

were clearly separated. They had a mobility respectively of 14·4 and 9·6 × 10^{-5} cm^2 volt/s. Since at the end of the run, they were not present in the electrophoretic pattern, their percentage is not included in the data of Table I.

The final electrophoretic pattern is reproduced in the Figure. 6 components identified with the letters from *a* to *f* are apparent, of which *c* is quantitatively the most important, corresponding to more than 60% of the total proteins. The mobilities of these components are tabulated in Table II.

From Table I it is evident that no qualitative modifications took place in the patterns from adrenalectomized or fasted rats in comparison with the normals. From a quantitative point of view, the analysis of soluble proteins from adrenalectomized rats showed a statistically significant percentage decrease of components *a* and *b* in comparison with the normals.

Table II.—Mobilities of electrophoretic fractions of soluble proteins of lymphatic tissue

Fraction . . .	*a*	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
Mobility* . . .	6·07	5·58	4·59	3·28	2·54	1·64

* × 10^{-5} cm^2 $volt^{-1}$ s^{-1}.

Soluble proteins of normal lymphatic tissue have been studied by Abrams and Cohen[5] and by Roberts and White[6], who found 6–7 components with a wide range of mobilities. In extracts of isolated lymphocytes, White and Dougherty[7] and Harris, Moore, and Farber[8] found 6—7 or respectively 3 components. Our results are therefore in broad agreement with those of the previous authors.

The main result of the present investigation is that in the experimental conditions employed, in which lymphatic tissue undergoes marked weight and morphological variations, very small or no modifications are appreciable in the electrophoretic patterns of the soluble proteins. This is particularly striking in the case of fasting, when the loss of lymphocytes is great and the lymphatic organs appear to be constituted mainly of reticulo-endothelial cells.

After adrenalectomy, where an increase of the lymphocytes content of the tissues is evident, two small fast components show a statistically significant decrease. It seems appropriate to recall here that White and Dougherty[7] found, in lymphocytes, isolated from lymph nodes draining territories in which an antigen had been injected, an increase in the fast electrophoretic components. These results seem, therefore, to indicate a correlation between these fast components and the functional activity of lymphocytes (presumably increased after the injection of the antigen and decreased after adrenalectomy).

The Authors are indebted to Miss A. Montella for valuable assistance in the course of this work.

C. Pellegrino and A. Torcigliani

Department of general Pathology, University of Pisa, Italy, June 14, 1955.

Zusammenfassung

Elektrophoresediagramme von löslichen Proteinen des lymphatischen Gewebes wurden geprüft unter zwei experimentellen Bedingungen, die Gewichtsveränderungen des lymphatischen Gewebes in entgegengesetzten Richtungen bewirkten (rascher Gewichtsverlust bei Hungertieren und Gewichtszunahme nach Adrenalektomie).

Im Vergleich mit Kontrolltieren zeigten die Elektrophoresediagramme unter diesen Versuchsbedingungen keine qualitativen Veränderungen. Nur nach Adrenalektomie war die Konzentration zweier kleiner Komponenten signifikant geringer als bei Normaltieren.

$C_{(14)}$-Substituted Corticosteroids. Some D Ring Transformations in the Compound S Series

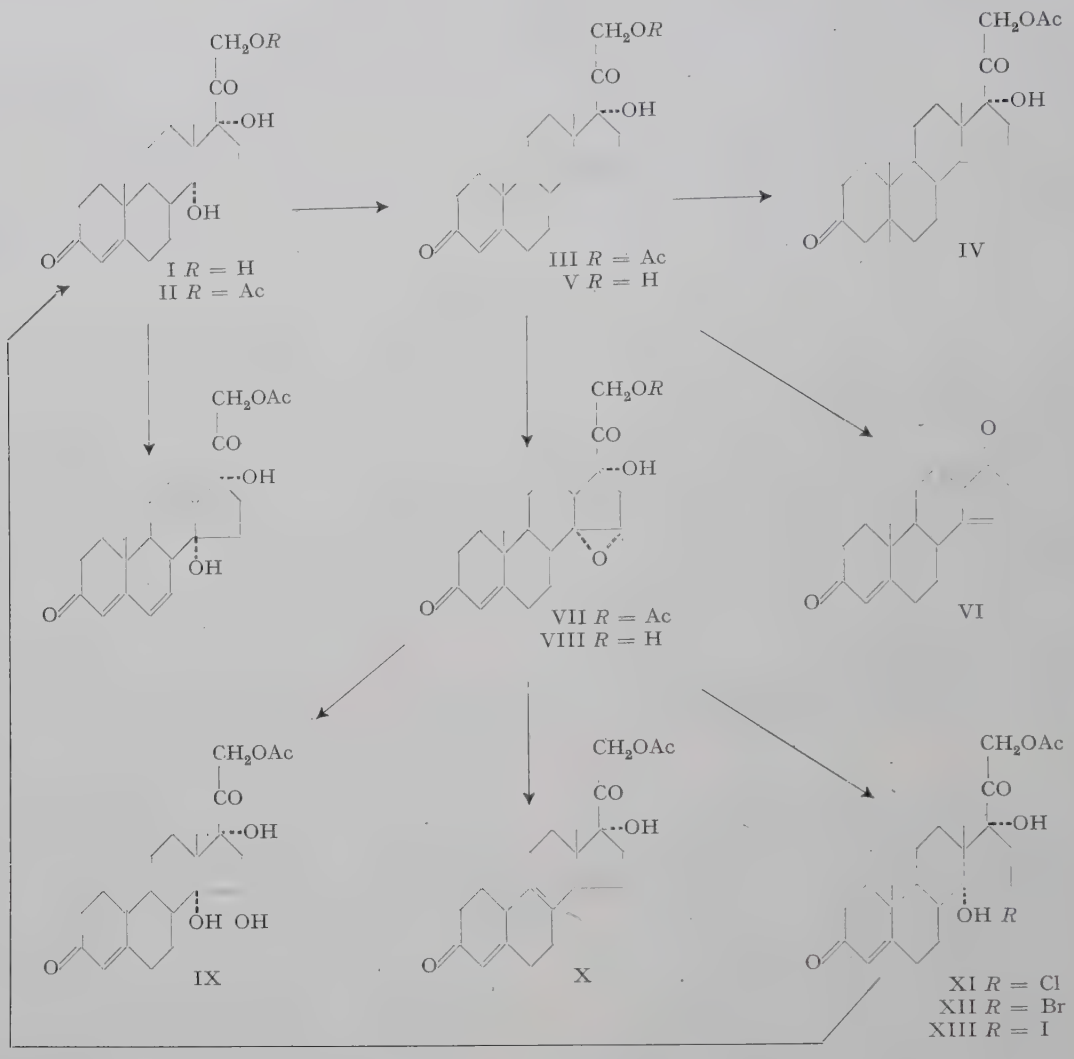
The current interest in substituted analogs of cortisone and hydrocortisone as anti-inflammatory agents has recently been stimulated by the reported synthesis of several compounds displaying heightened glucocorticoid activity as well as markedly divergent mineralocorticoid properties[1]. In searching for new therapeutic agents of this type, we have prepared as model compounds several $C_{(14)}$-substituted derivatives of Reichstein's Compound S. The synthesis of the corresponding 11-oxygenated compounds and their biological activities has been reported elsewhere[2].

The preparation of $C_{(14)}$-substituted derivatives of Compound S was accomplished from Δ^4-pregnene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione (14α-hydroxy Compound S)

[5] A. Abrams and P. P. Cohen, J. biol. Chem. *177*, 439 (1949).
[6] S. Roberts and A. White, J. biol. Chem. *178*, 151 (1949).
[7] A. White and T. F. Dougherty, Endocrinology *36*, 207 (1945).
[8] T. N. Harris, D. H. Moore, and M. Farber, J. biol. Chem. *179*, 369 (1949).

[1] J. Fried *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2273 (1953); *76*, 1455 (1954); *77*, 1068 (1955); *77*, 4181 (1955). – A. Nobile *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4184 (1955). – R. F. Hirschmann, R. Miller, R. E. Beyler, L. H. Sarett, and M. Tishler, J. Amer. chem. Soc. *77*, 3166 (1955). – J. A. Hogg *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4438 (1955). – E. Vischer, Ch. Meystre, and A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 835 (1955).

[2] E. J. Agnello, B. M. Bloom, and G. D. Laubach, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4684 (1955); Abstracts of 128th Meeting, Amer. Chem. Soc., Minneapolis, Minn., September 11–16, 1955, p. 50.



(I)[3]. Acetylation of I with acetic anhydride-pyridine gave the 21-monoacetate II which could be selectively dehydrated with *p*-toluenesulfonic acid in refluxing benzene to afford in excellent yield $\Delta^{4,14}$-pregnadiene-17α, 21-diol-3, 20-dione acetate (III), m.p. 201·4–202·8°; $[\alpha]_D$ + 75° (dioxane); ε EtOH/240 = 16,200; λ KBr/max 3·05, 5·74, 5·82, 6·09, 6·25, 8·13; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{30}O_5$: C, 71·5; H, 7·82. Found: C, 71·7; H, 8·02). The formation of even trace amounts of the corresponding $\Delta^{8(14)}$-isomer was not detected in this reaction[4]. This tendency of 14α-hydroxy steroids upon dehydration to yield $C_{(14)}$-$C_{(15)}$ unsaturated products to the apparent exclusion of the isomeric $\Delta^{8(14)}$-olefins represents a notably specific elimination reaction also observed in the 17-keto[5]- and desoxycorticosterone[6] series. It might be expected from the favorably planar transition state geometry involved [8β H(*p*), 14α OH(*p*)] that the $\Delta^{8(14)}$-isomer would be the predominant product in such dehydrations. Actually the prevailing situation probably resembles that suggested by Corey[7] to explain the unusual stability toward base of 6-keto-7α-bromosteroids, where the bulky axial methyl groups at $C_{(10)}$ and $C_{(13)}$ hinder the successful removal of a proton from $C_{(8)}$ by solvent or a base[8]. Models reveal that the 15β-

[3] H. C. Murray and D. H. Peterson, U.S. 2,602,769, July 8, 1952; U.S. 2,673,866, March 30, 1954. – P. D. Meister *et al.*, Abstracts of Papers, 123rd Amer. Chem. Soc. Meeting, Los Angeles, Calif., March 15–19, 1953, p. 5C.

[4] Treatment of II with anhydrous hydrogen chloride in chloroform at 0° also led to III.

[5] A. F. St. André, H. B. MacPhillamy, J. A. Nelson, A. C. Shabica, and C. R. Scholz, J. Amer. chem. Soc. *74*, 5506 (1952). – Activated 14α-hydroxyl functions are known to dehydrate readily toward $C_{(15)}$ under mild acidic conditions. *Cf.* G. D. Laubach, E. C. Schreiber, E. J. Agnello, E. N. Lightfoot, and K. J. Brunings, J. Amer. chem. Soc. *75*, 1514 (1953). – N. L. McNiven, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1725 (1954).– A. Zürcher, H. Heusser, O. Jeger, and P. Geistlich, Helv. chim. Acta *37*, 1562 (1954).

[6] Private communication from Dr. Howard Ringold of Syntex, S.A.

[7] E. J. Corey, J. Amer. chem. Soc. *76*, 175 (1954).

[8] Even in the case of a 14α-hydroxysteroid where the 8β-hydrogen enjoys ketonic activation, facile dehydration to form a $C_{(8)}$-$C_{(14)}$-double bond is not observed. The product of *N*-bromosuccinimide halogenation of II (Δ^4-6-bromopregnene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione acetate, m.p. 128·8–129·9° (dec.); Calculated for $C_{23}H_{31}O_6Br$: Br, 16·34%. Found: Br, 16·34%) upon refluxing with *s*-collidine affords $\Delta^{4,6}$-pregnadiene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione acetate, m.p. 223·2–223·8°, $[\alpha]_D$ + 51° (dioxane); ε EtOH/283 = 28,100; λ KBr/max 3·02, 3·14, 5·74, 5·82, 6·10, 6·22, 6·34, 8·21, 11·38; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{30}O_6$: C, 68·6; H, 7·51. Found: C, 68·7; H, 7·58). During these experiments we have not detected the characteristic ultraviolet chromophore of the conjugated trienone which might be expected to arise under such vigorous conditions *via* base-catalyzed elimination of water in the vinylogous β-hydroxy ketone.

hydrogen is considerably less subject to steric effects of this type in the dehydration of 14α-hydroxysteroids.

Attempts to reduce the isolated double bond in III revealed a marked resistance of this unsaturation to catalytic hydrogenation[9], in contrast to the readily reducible "β"-anhydro (Δ^{14}) compounds prepared from cardiac aglycones[10]. Although the presence of a neighboring 17-hydroxyl group on the "α"-face could presumably account for this observation as due to steric hindrance, the necessity remained for unequivocal demonstration that the newly introduced unsaturation in III was between $C_{(14)}$ and $C_{(15)}$. This was accomplished by degradation of the cortical side chain to afford the corresponding 17-ketosteroid. Saponification of III with dilute methanolic potassium carbonate gave $\Delta^{4,14}$-pregnadiene-17α, 21-diol-3, 20-dione (V), m.p. 196·8 — 198·8°; $[\alpha]_D$ + 52° (dioxane); εEtOH/240 = 16,100; λKBr/max 2·98, 5·85, 6·04, 6·22; (*Anal.* Calculated for $C_{21}H_{28}O_4$: C, 73·2; H, 8·19. Found: C, 72·9; H, 7·97). Side chain cleavage of V with sodium bismuthate[11] afforded $\Delta^{4,14}$-androstadiene-3, 17-dione (VI), m.p. 138·8–140·8°; $[\alpha]_D$ + 246° ($CHCl_3$); εEtOH/237 = 15,600; λKBr/max 5·78, 6·04, 6·23; (*Anal.* Calculated for $C_{19}H_{24}O_2$: C, 80·2; H, 8·50. Found: C, 80·1; H, 8·39)[12]. When subjected to catalytic hydrogenation over 25% palladium on calcium carbonate, VI rapidly absorbed *two moles* of hydrogen producing what appeared to be a mixture of the two $C_{(5)}$-isomeric, 14β-tetrahydro compounds[13], m.p. 171 — 175°; $[\alpha]_D$ + 97° ($CHCl_3$); λKBr/max 5·82, 5·88; no selective absorption in the ultraviolet region; (*Anal.* Calculated for $C_{19}H_{28}O_2$: C, 79·1; H, 9·79. Found: C, 78·9; H, 9·71).

Epoxidation of III with perphthalic acid or sodium dichromate in aqueous acetic acid[15] led to Δ^4-14α, 15α-epoxidopregnene-17α, 21-diol-3, 20-dione acetate (VII)[16], m.p. 178·2–179·2°; $[\alpha]_D$ + 119·6° (dioxane); εEtOH/237 = 17,700; λKBr/max 2·92, 5·74 (shoulder), 5·79, 6·03, 6·22, 8·10; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{30}O_6$: C, 68·6; H, 7·51. Found: C, 68·4; H, 7·46)[17]. Saponification afforded the parent alcohol VIII, m.p. 229·6–232·2°; $[\alpha]_D$ + 135° (dioxane); εEtOH/239 = 17,400; λKBr/max 2·94, 5·83, 6·09, 6·23; (*Anal.* Calculated for $C_{21}H_{28}O_5$: C, 70·0; H, 7·83. Found: C, 69·7; H, 7·50).

Although stable to the action of moderately acidic reagents[18], the epoxide VII reacted readily with strong acids leading to a number of transformation products. Perchloric acid in aqueous acetone solution[19] effected hydrolytic scission of the epoxide linkage yielding a mixture of compounds. Chromatographic separation afforded a glycol tentatively formulated as Δ^4-pregnene-14α, 15β, 17α, 21-tetrol-3, 20-dione acetate (IX), m.p. 250·8 – 253·2°; $[\alpha]_D$ + 114° (dioxane); εEtOH/242 = 17,400; λKBr/max 3·00, 3·07, 5·71, 5·88, 6·04, 6·24, 8·20; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{32}O_7$: C, 65·7; H, 7·67. Found: C, 65·5; H, 7·64). Selective dehydrative cleavage of the epoxide VII with *p*-toluenesulfonic acid in refluxing benzene solution led to $\Delta^{4,8,14}$-pregnatriene-17α, 21-diol-3, 20-dione acetate (X), m.p. 184·6–188·0°; εEtOH/241 = 28,600; λKBr/max 2·99, 5·76, 5·81, 6·05, 6·19, 6·36, 8·13.

The action of anhydrous hydrogen chloride in chloroform on VII at 0° for four hours afforded Δ^4-15β-chloropregnene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione acetate (XI), m.p. 196·8–200·2° (dec.); $[\alpha]_D$ + 89° (dioxane); εEtOH/240 = 16,550; λKBr/max 2·98, 3·16, 5·72, 5·82, 6·16, 6·27, 8·19; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{31}O_6Cl$: C, 62·9; H, 7·12; Cl, 8·08. Found: C, 62·7; H, 7·07; Cl, 8·21). Anhydrous hydrogen bromide in chloroform at – 15° for 1 h produced Δ^4-15β-bromopregnene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione acetate (XII) in either of two polymorphic modifications displaying markedly different infrared spectra in potassium bromide suspension, but identical spectra in chloroform solution, m.p. 159·4–162·4° (dec.) or 175·0–177·0° (dec.); $[\alpha]_D$ + 34° (dioxane); εEtOH/238 = 16,270; λ$CHCl_3$/max 2·96, 5·76, 5·80, 6·05, 6·22; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{31}O_6Br$: C, 57·1; H, 6·46; Br, 16·3. Found: C, 57·3; H, 6·52; Br, 17·0). The epoxide VII in chloroform solution reacted with 48% hydriodic acid at 5° for 20 min to give Δ^4-15β-iodopregnene-14α, 17α, 21-triol-3, 20-dione acetate (XIII)[20], m.p. 128·4–131·2° (dec.); $[\alpha]_D$-22° (dioxane); εEtOH/237 = 18,000; λKBr/max 2·99, 5·74, 5·80, 6·10, 6·21, 8·11; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{31}O_6I$: C, 52·1; H, 5·89; I, 23·93. Found: C, 51·8; H, 5·77; I, 25·28.) Supporting evidence for the 14α-

[9] Hydrogenation of III over 25% palladium on calcium carbonate in dioxane or ethanol gave Δ^{14}-pregnene-17α, 21-diol-3, 20-dione acetate (IV), m.p. 154·2–154·8°; $[\alpha]_D$ + 15° (dioxane); λKBr/max 3·05, 5·72, 5·82, 5·93, 8·13; no selective absorption in the ultraviolet region; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{32}O_5$: C, 71·1; H, 8·30. Found: C, 71·1; H, 8·35). Similarly platinum oxide in acetic acid failed to effect saturation of the D ring.

[10] H. M. E. Cardwell and S. Smith, J. chem. Soc. *1954*, 2012.

[11] C. J. W. Brooks and J. K. Norymberski, Biochem. J. *55*, 371 (1953).

[12] Dr. St. André of CIBA has kindly provided us with the unpublished constants [Chem. Rev. *53*, 114 (1953)] of a sample of VI prepared from 3β-acetoxy-$\Delta^{5,14}$-androstadiene-17-one[8]. This sample displayed: m.p. 137–139°; $[\alpha]_D$ + 249° ($CHCl_3$); ε_{239} = 16,377.

[13] Since androstanedione melts at 132–133° and etiocholanedione melts at 132–134°, while 14-isoandrostanedione[14] melts at 184–186°; $[\alpha]_D$ + 110° ($CHCl_3$); it seems likely that only β-face hydrogenation has occurred at $C_{(14)}$.

[14] A. F. St. André, H. B. MacPhillamy, J. A. Nelson, A. C. Shabica, and C. R. Scholz, J. Amer. chem. Soc. *74*, 5506 (1952).

[15] The formation of identical epoxidation products from highly substituted olefins using either peracids or chromate oxidizing agents has been observed frequently [*cf.* H. Reich and A. Lardon, Helv. chim. Acta *30*, 329 (1947). – C. W. Shoppee, Helv. chim. Acta *30*, 766 (1947)]. A recent example in the terpene series is cited by J. D. Johnston and F. S. Spring, J. chem. Soc. *1954*, 1556.

[16] Preferential α-face attack by bulky reagents in the steroid series is thoroughly documented. *Cf.* L. F. Fieser, Exper. *6*, 312 (1950). – Pl. A. Plattner *et al.*, Helv. chim. Acta *29*, 2023 (1946). – T. F. Gallagher and T. H. Kritchevsky, J. Amer. chem. Soc. *72*, 882 (1950). – G. H. Alt and D. H. R. Barton, J. chem. Soc. *1954*, 1356. – P. Bladon, J. chem. Soc. *1954*, 736.

[17] In both Zaffaroni and Bush paper chromatographic systems, VII displayed a remarkable *Rf* value, being markedly *less polar* than Compound S acetate. We attribute this behavior to a shielding effect of the epoxide oxygen, preventing effective contact of the more polar 17α-hydroxyl grouping with the absorbing surface.

[18] Unsuccessful attempts were made to cleave the epoxide linkage in VII with boiling acetic acid [J. Pataki, G. Rosenkranz, and C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. *73*, 5375 (1951). – A. Fürst and Pl. A. Plattner, Helv. chim. Acta *32*, 275 (1949)], thiocyanic acid [E. E. van Tamelen, J. Amer. chem. Soc. *73*, 3444 (1951)], pyridine hydrobromide [P. N. Chakravorty and R. H. Levin, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 2317 (1942)], thiourea and *p*-toluenesulfonic acid [L. C. King and J. A. Campell, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3556 (1949)], magnesium bromide etherate [W. E. Bachmann, J. P. Horwitz, and R. J. Warzynski, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3268 (1953). – R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3484 (1953)], and trichloroacetic acid in benzene [A. Fürst and R. Scotoni, Jr., Helv. chim. Acta *36*, 1410 (1953)].

[19] *Inter al.*, S. A. Julia and H. Heusser, Helv. chim. Acta *35*, 2080 (1952).

[20] More vigorous reaction conditions resulted in the formation of III as the predominant product. The reduction of steroid epoxides to the parent olefins by hydriodic acid has been previously observed. [J. Fried *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2273 (1953);

hydroxy-15β-halo formulation is derived from the observation that the halohydrins are converted back to the parent oxide with potassium acetate in ethanol, while the bromohydrin afforded II upon treatment with Raney nickel[21] under carefully defined conditions. Zinc dust in acetic acid[22] at room temperature converted XII to III, but unchanged starting material was recovered when XII was allowed to react with potassium iodide in refluxing acetone[23]. The chlorohydrin XI was not attacked by chromic acid.

In those steroid olefins where the direction of attack by bulky electrophilic reagents is rigidly determined by steric factors (*inter al.*: $\Delta^{9(11)}$-and Δ^{11}-compounds), the addition of hypobromous acid followed by elimination of the elements of hydrogen bromide has invariably led to epoxides[24] isomeric with those resulting from direct peracid oxidation. Attempts to apply such a procedure to the D-ring olefin III provided unusual results which we attribute to participation of the neighboring cortical side chain. When III was allowed to react with *N*-bromoacetamide in aqueous dioxane containing perchloric acid, the product isolated directly was a *halogen-free* compound XIV, m.p. 242·4–245·8° w.p.s.; $[\alpha]_D + 23°$ (dioxane); εEtOH/237 = 17,900; λKBr/max 2·93, 5·77, 5·94, 6·04, 6·21, 8·13; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{39}O_6$: C, 68·6; H, 7·51. Found: C, 68·7; H, 7·65). The infrared spectrum of XIV displayed no additional hydroxyl or carbonyl bands and this fact considered along with the unreactiveness of the compound toward perphthalic acid and the chromic acid-pyridine complex[25] led to the conclusion that the newly introduced oxygen atom was present in a cyclic ether linkage. The reaction of XIV with anhydrous hydrogen chloride in chloroform for 4 h at 0° gave a chlorohydrin XV, m.p. 177·4–179·2° (dec.); $[\alpha]_D + 101°$ (dioxane); εEtOH/240 = 16,750; λKBr/max 2·96, 5·71, 5·85, 6·06, 6·21, 8·13; (*Anal.* Calculated for $C_{23}H_{31}O_6Cl$: C, 62·9; H, 7·12; Cl, 8·08. Found: C, 63·0; H, 7·14; Cl, 7·97). The chlorohydrin could be recovered unchanged after treatment with chromic anhydride in acetic acid, *suggesting the absence of a secondary hydroxyl function*. The possibility that a skeletal rearrangement had occurred during the preparation of the chlorohydrin was excluded by converting back to XIV with potassium acetate in refluxing ethanol. Further structure studies on the cyclic ether XIV and related compounds are underway.

Barry M. Bloom, E. J. Agnello, and G. D. Laubach

Research Laboratories Chas. Pfizer and Co., Inc., Brooklyn 6, N. Y., September 21, 1955.

Zusammenfassung

Eine Anzahl am D-Ring substituierter Derivate von Reichsteins Verbindung S wurde als Modellverbindungen in der Synthese neuer Corticosteroide hergestellt. Die beschriebenen Strukturtypen schliessen Dehydroverbindungen, Epoxyde, Halogenhydrine und ein Glykol ein.

[21] P. L. Julian *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *72*, 5145 (1950). – L. B. Barkley, M. W. Farrar, W. S. Knowles, and H. Raffelson, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 5017 (1953). – J. Schmidlin and A. Wettstein, Helv. chim. Acta *36*, 1241 (1953). – G. P. Mueller, R. E. Stobaugh, and R. S. Winniford, J. Amer. chem. Soc. *75*, 4888 (1953). – J. W. Cornforth, J. M. Osbond, and G. H. Phillips, J. chem. Soc. *1954*, 907.

[22] L. F. Fieser and X. A. Dominguez, J. Amer. chem. Soc. *75*, 1704 (1953).

[23] J. Fried *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2273 (1953).

[24] J. Fried *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2273 (1953). – G. H. Ott and T. Reichstein, Helv. chim. Acta *26*, 1799 (1943).

[25] G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler, and L. H. Sarett, J. Amer. chem. Soc. *75*, 422 (1953).

Leukozytenemigrationsfördernde Wirkung von Crotonöl

In einer früheren Arbeit haben wir beschrieben, dass unter den entzündungserregenden Stoffen das Crotonöl insofern eine besondere Stellung einnimmt, als dieses neben starker lokaler Reizwirkung und Entzündungserregung eine hochspezifische, chemotaktische und leukozytenwanderungsfördernde Wirkung *in vitro* besitzt[1]. Es ist seit längerem von Berenblum[2] beschrieben worden, dass Crotonöl eine tumorrealisierende Wirkung hat. Diese Frage wurde in letzter Zeit von Danneel[3] bearbeitet, der zeigen konnte, dass die entzündungserregenden Anteile nicht diejenigen sind, welche eine tumorrealisierende Wirkung besitzen. Sicé und Mitarbeiter[4] konnten weiterhin zeigen, dass unter anderem Alkoholextrakte zu Hauthyperplasie, aber nicht zu Hautschäden führen. Es schien bei dieser Situation interessant, den Versuch zu machen, die chemotaktisch wirksamen Stoffe mit den anderen Wirkungen in Zusammenhang zu bringen. Es war versprechend, die gleichen Fraktionen wie Danneel zu untersuchen. Auf unsern Wunsch war Danneel so freundlich, uns die entsprechenden Fraktionen zur Verfügung zu stellen. Diese konnten ebenfalls verglichen werden mit den in unserer chemischen Abteilung von A. Marxer hergestellten Fraktionen, über deren Untersuchungen wir im einzelnen später berichten werden. Wir haben die von Danneel uns zur Verfügung gestellten Fraktionen sowohl auf ihre Leukozytenwirkung wie auch auf ihre Reizwirkung an der Konjunktiva des Kaninchens untersucht. Es ergab sich, dass vor allen Dingen zwei Fraktionen eine Wirkung auf Leukozyten besitzen; die eine hat zudem eine ausgesprochene entzündungserregende bzw. Reizwirkung. Diese Fraktion findet sich im Chloroformextrakt 3*a*, 3*b* und 3*c*, wobei 3*c* die wirksamste Unterfraktion zu sein scheint. Die zweite Fraktion mit leukotaktischer Wirkung findet sich in der Alkoholfraktion, die keine oder nur eine sehr geringe Reizwirkung besitzt. Die vorstehenden Untersuchungen ergeben somit, dass die Reizwirkung und die Leukozytenwirkung in einer Fraktion gemeinsam vorhanden sind, in der Alkoholfraktion aber nur die Leukozytenwirkung vorliegt. Es ist noch nicht zu schliessen, dass die chemotaktischen Stoffe dieser beiden Fraktionen identisch sind. Auf Grund der Danneelschen und Sicéschen Untersuchungen im Vergleich zu unseren kann gesagt werden, dass die tumorrealisierende Wirkung mit grosser Wahrscheinlichkeit mit der auf Leukozyten wirksamen Substanz nicht identisch ist und dass die Leukozytenwirkung sich in gewissen Fraktionen abtrennen lässt von den reizenden und hautschädigenden Komponenten. Es bestätigen somit diese Befunde unsere eigenen früheren Feststellungen[5], dass im Crotonöl hochwirksame, spezifisch

[1] R. Meier, P. Desaulles und B. Schär, Arch. exp. Path. und Pharm. *224*, 104 (1955).

[2] J. Berenblum und P. Shubik, Brit. J. Canc. *1*, 379 (1947).

[3] R. Danneel und N. Weissenfels, Naturwissenschaften *42*, 128 (1955).

[4] 3. Internationaler Biochemie-Kongress Brüssell.

[5] Zusammen mit A. Marxer, unpubliziert.

Wirkung von Crotonölextrakten auf die Auswanderung von Hühnerleukozyten *in vitro*.

		10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Petroläther	1*a*–1*c*	∅	∅	∅
Benzol	2*a*–2*c*	∅	∅	∅
Chloroform	3*a*	+	+	∅
	3*b*	+	+	∅
	3*c*	+	+	+
Äther	4*a*–4*c*	(+)	∅	∅
Aceton	5*a*–5*c*	∅	∅	∅
Alkohol	6*a*	+	+	+
	6*b*	+	∅	∅
	6*c*	+	∅	∅

\+ = Förderung der Auswanderung 16 h
∅ = Keine Wirkung

leukozytotaktische Substanzen vorhanden sind, deren Natur vorläufig noch nicht abgeklärt ist, und weiterhin im Vergleich mit den Untersuchungen von DANNEEL, dass im Crotonöl mehrere offenbar chemisch verschiedene Substanzen mit hochspezifischer biologischer Wirkung vorliegen.

B. SCHÄR und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 15. August 1955.

Summary

Various croton oil fractions were studied with regard to their *in vitro* effect on leucocytes and their irritative action. It was discovered that there exist fractions exerting a stimulating effect on leucytic migration and an irritative action and other fractions having a leucocytic stimulating effect without pronounced irritative action. The co-carcinogenic fractions of DANNEEL have no promotory effect on the migration of leucocytes.

Identificazione della 5-OH-Triptamina nei trombociti degli uccelli

Il fattore vasocostrittore[1] nelle piastrine dei mammiferi è stato identificato da BRACCO e CURTI[2] e susseguentemente da ZUCKER, RAPPORT e FRIEDMAN[3] con la 5-OH-triptamina, sostanza scoperta da RAPPORT[4] nel siero di bue. La 5-OH-triptamina non è presente in altri elementi del sangue al di fuori delle piastrine, e compare nel siero quando avviene la coagulazione[5].

Nel sangue degli uccelli le funzioni piastriniche si suppone siano svolte dai cosidetti trombociti, cellule nucleate morfologicamente differenti dalle piastrine dei mammiferi. Lo scopo di questa ricerca è quello di dimostrare la presenza di 5-OH-triptamina nei trombociti del sangue degli uccelli.

Gli esperimenti sono stati condotti usando sangue di pollo e di oca. Il sangue prelevato dalla vena dopo iniezione di eparina con ago e siringa siliconati, veniva diluito in 3 volumi di una soluzione preparata mescolando 5 parti di NaH_2PO_4 0,2 *M*, 5 parti di Na_2HPO_4 0,2 *M* e 2 parti di ossalato di sodio al 4%, mantenuta a bassa temperatura (4–6°C). I trombociti venivano separati per centrifugazione frazionata in una centrifuga refrigerata e lavati 2 volte con 3 volumi di soluzione fisiologica.

Era così possibile ottenere una sospensione di trombociti ben conservati e praticamente purificati da altri elementi (Fig. 1).

Estratti di trombociti venivano preparati per le determinazioni chimiche e farmacologiche nel seguente modo. 30–60 mg di trombociti freschi venivano sospesi in 5 volumi di etanolo e lasciati in frigorifero per 12 h. Dopo agitazione per 10 min la miscela veniva centrifugata e il sopranatante limpido veniva prelevato e tirato a secco sotto vuoto. Il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di acqua, di cloroformio e di etanolo e trasferito su carta Whatman N° 4 in 5 distinte macchie. Sulla stessa carta veniva posta una macchia di controllo di 15 μg di 5-OH-triptamina. La separazione cromatografica veniva eseguita a mezzo di irrigazione ascendente con una miscela di cloroformio, etanolo e acqua nel rapporto 80:50:20. Dopo una corsa del fronte del solvente di 20 cm, la carta veniva asciugata in aria ambiente. La striscia del controllo e una striscia dell'estratto venivano spruzzate con acido sulfanilico diazotato ed esposte a vapori di ammoniaca: in ambedue compariva una macchia rossa con Rf = 0,43, cangiante al violetto dopo esposizione a vapori di HCl. Una seconda striscia dell'estratto, spruzzata con *p*-dimetilaminobenzaldeide e seccata a 80°C, mostrava una macchia violetta con lo stesso Rf della 5-OH-triptamina. Una macchia blu nella stessa posizione veniva dimostrata in una terza striscia dell'estratto con il reattivo di Folin-Ciocolteau (Fig. 2). Le porzioni corrispondenti della quarta e quinta striscia dell'estratto venivano eluite in 4 ml di HCl *N*/500 con agitazione per ½ h. Lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto di questo eluito risultò del tutto simile a quello riportato nella Figura 4. Con una piccola quantità dell'eluito si saggiava l'attività sull'utero di ratta, isolato 24–30 h dopo iniezione di 10

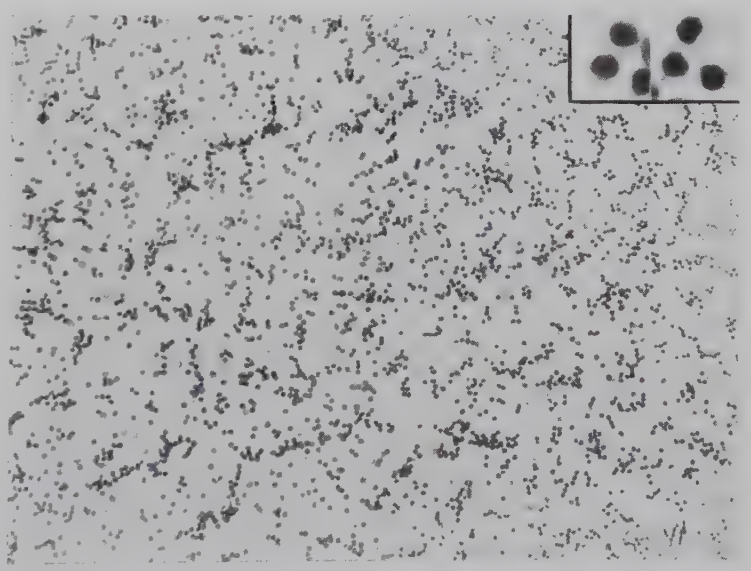


Fig. 1.–Trombociti separati dal sangue di pollo, colorati con May-Grünwald-Giemsa, × 90. All'angolo superiore destro gli stessi elementi, × 900.

[1] M. B. ZUCKER, Amer. J. Physiol. *148*, 275 (1947).

[2] M. BRACCO e P. C. CURTI, Haematologica *37*, 721 (1953); Exper. *10*, 71 (1954).

[3] M. B. ZUCKER, B. K. FRIEDMAN e M. RAPPORT, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *85*, 282 (1954).

[4] M. RAPPORT, J. biol. Chem. *180*, 961 (1949).

[5] M. BRACCO e P. C. CURTI, Ann. Villaggio Sanat. Sondalo *1*, 180 (1953). – M. B. ZUCKER e J. BORRELLI, J. appl. Physiol. *7*, 425, 432 (1955).

μg/100 g di dietilstilbestrolo, e sull'intestino isolato di cavia. Ambedue gli organi presentarono contrazione come con la 5-OH-triptamina.

Fig. 2.–Cromatografia su carta. *1* 5-OH-triptamina, con acido solfanilico diazotato; *2* estratto di trombociti, con acido solfanilico diazotato; *3* estratto di trombociti con Folin-Ciocolteau; *4* estratto di trombociti con *p*-dimetilaminobenzaldeide.

La quantità restante dell'eluito veniva tirata a secco; il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di HCl N/500 e posto su carta Whatman N° 4 in un'unica macchia. Sulla stessa carta si poneva una macchia di controllo di 10 μg di 5-OH-triptamina. Si eseguiva separazione elettroforetica per 4 h in tampone acetato a pH 5,1 con 200 V e 0,28 mA/cm. La carta veniva seccata in aria ambiente e spruzzata con acido sulfanilico diazotato. Sia la striscia di controllo che la striscia dell'estratto presentavano un'unica macchia rossa (Fig. 3).

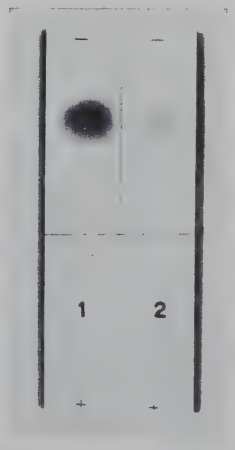


Fig. 3. Elettroforesi su carta: *1* 5-OH-triptamina; *2* eluito della porzione del cromatogramma di estratto di trombociti corrispondente alla macchia della 5-OH-triptamina.

In una seconda serie di esperimenti gli estratti etanolici di 30–60 mg di trombociti freschi venivano tirati a secco sotto vuoto. Il residuo veniva estratto con 2 ml di acqua, 2 ml di cloroformio e 0,5 ml di etanolo con agitazione per 10 primi. La miscela veniva centrifugata e il sopranatante limpido privo di lipidi veniva aspirato e tirato a secco sotto vuoto. Il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di HCl N/500 e posto su carta Whatman in un unica macchia. Una macchia di controllo di 10 μg di 5-OH-triptamina veniva posta sulla stessa carta. Si eseguiva elettroforesi in tampone acetato pH 5,1, 200 V e 0,28 mA/cm per 4 h. La carta veniva asciugata in aria ambiente. La striscia di controllo veniva spruzzata con *p*-dimetilaminobenzaldeide e seccata a 80° C. La porzione della striscia dell'estratto, corrispondente alla machia violetta sulla striscia di controllo, veniva eluita con 5 ml di HCl N/500 agitando per ½ h. Lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto di questo eluito è riportato nella Figura 4, unitamente allo spettro di una soluzione di 5-OH-triptamina. Le deviazioni della curva dell'estratto di trombociti da quella della 5-OH-triptamina sono lievi e corrispondono alle variazioni osservate negli estratti di piastrine di mammiferi[6].

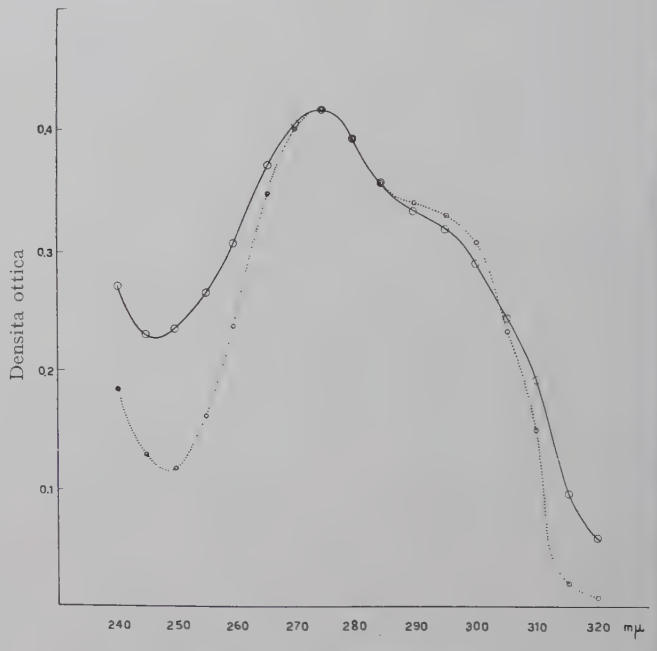


Fig. 4.–Spettri di assorbimento nell'ultravioletto di 5-OH-triptamina (linea punteggiata) e dell'eluito della porzione della striscia elettroforetica corrispondente alla macchia di 5-OH-triptamina (linea solida).

Il contenuto in 5-OH-triptamina degli estratti così preparati, calcolato dalla lora densità ottica a 2750 Å in riferimento a una soluzione standard di 5-OH-triptamina[7], era di circa 350 μg per grammo di trombociti freschi di oca. Valori simili si ottenevano anche con determinazioni colorimetriche secondo la tecnica da noi proposta per il dosaggio quantitativo della 5-OH-triptamina nel sangue di uomo[7].

In estratti di plasma di globuli rossi e di globuli bianchi completamente purificati dalle piastrine non è stato possibile dimostrare la presenza di 5-OH-triptamina.

In conclusione gli esperimenti riferiti dimostrano senza alcun dubbio che è possibile estrarre dai trombociti di pollo e di oca una sostanza che corrisponde perfettamente nelle sue caratteristiche chimiche spettrofotometriche e biologiche alla 5-OH-triptamina. Di conseguenza i trombociti degli uccelli, per quanto riguarda

[6] M. B. Zucker, B. K. Friedman e M. Rapport, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *85*, 282 (1954).

[7] M. Bracco, P. C. Curti e V. Giuliano, Il Farmaco *10* (1955).

il fattore vasocostrittore, devono essere considerati funzionalmente identici alle piastrine dei mammiferi.

M. Bracco, P. C. Curti e V. Giuliano

Istituto di Patologia Medica, Università di Genova, e Laboratorio Centrale Villaggio Sanatoriale di Sondalo, il 17 giugno 1955.

Summary

From extracts of purified bird thrombocytes, obtained by differential centrifugation of chicken and goose blood, it has been possible to separate a material which corresponds perfectly in chemical, spectrophotometric, and biological properties to 5-OH-tryptamine. Bird thrombocytes, therefore, as far as the vasoconstrictor factor is concerned, are physiologically identifiable with mammalian platelets.

La pression intrarénale chez l'homme

L'hypothèse qu'une augmentation de pression intrarénale (p.i.r.), interférant avec l'irrigation sanguine de l'organe et la formation de l'urine, puisse jouer un rôle au cours de diverses néphropathies n'a jamais été étayée par des mesures objectives. Elle est néanmoins défendue par certains auteurs[1] qui recommandent de traiter les anuries aiguës et les néphrites interstitielles chroniques par la décapsulation.

La p.i.r. globale a été mesurée chez l'animal normal par quelques investigateurs[2]. Elle est en moyenne de 14 mm de mercure chez le lapin[3] et de 21[4] ou 25 mm[5] chez le chien. Elle dépend de la diurèse, de la pression artériolaire, de la pression veineuse et peut-être de la pression interstitielle. Elle ne varie pas sensiblement au cours de néphropathies expérimentales comme l'intoxication au tartrate de soude, au sublimé, au ferricyanure de potassium, ou la glomérulonéphrite de Masugi[3].

[1] U. Heim, Helv. chir. Acta *21*, 18 (1954). – O. Spühler, Schweiz. med. Wschr. *1953*, 145. – H. U. Zollinger, *Anurie bei Chromoproteinurie* (Thieme, Stuttgart 1952).

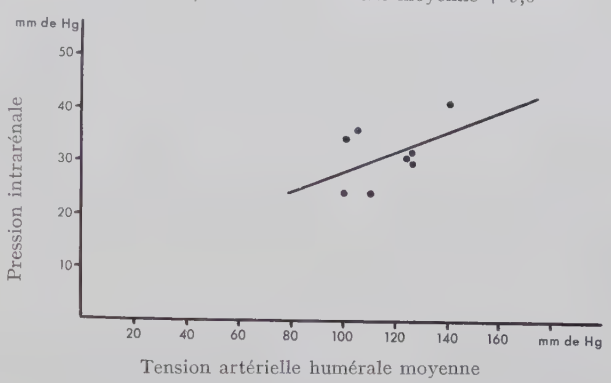
[2] C. W. Gottschalk, Amer. J. Physiol. *169*, 180 (1952). – B. E. Miles et H. E. de Wardener, J. Physiol. *123*, 131 (1954). – F. Reubi, C. r. Soc. hélv. Sci. nat. (sous presse). – E. G. Swann *et al.*, J. exper. Med. *92*, 625 (1950); Amer. J. Physiol. *168*, 637 (1952).

[3] F. Reubi, C. r. Soc. hélv. Sci. nat. (sous presse).

[4] B. E. Miles et H. E. de Wardener, J. Physiol. *123*, 131 (1954).

[5] E. G. Swann *et al.*, J. exper. Med. *92*, 625 (1950); Amer. J. Physiol. *168*, 637 (1952).

A notre connaissance, la p.i.r. n'avait jamais été, jusqu'ici, déterminée chez l'homme. Nous l'avons mesurée dans une première série de 8 cas en utilisant la technique suivante:



Pression intrarénale et tension artérielle chez 8 patients.

Notre appareil se compose d'un manomètre capillaire à mercure relié par une tubulure semi-rigide à une seringue et à une aiguille à ponction lombaire. La tubulure et la seringue sont remplies de Na Cl isotonique contenant 3% de Liquémine Roche. Grâce à un robinet séparateur on peut relier à volonté la seringue au manomètre ou à l'aiguille et le manomètre à l'aiguille. – Les mesures sont pratiquées sur un sujet assis, comme lors d'une ponction-biopsie du rein. La situation du rein droit a été précisée auparavant par une urographie. Après anesthésie locale, l'aiguille pourvue de son mandrin est introduite depuis l'angle costolombaire dans la direction voulue, jusqu'à ce que l'on sente une résistance élastique que l'on surmonte en enfonçant encore l'aiguille d'1–2 cm. A ce moment, le segment libre de l'aiguille décrit avec chaque mouvement respiratoire un trajet ellipsoïde caractéristique prouvant que son extrémité se trouve dans le parenchyme rénal. On retire le mandrin, on relie l'aiguille à la tubulure. On impose au manomètre une pression de 50 mm de mercure et on le met en communication avec l'aiguille. Le niveau du mercure s'abaisse alors lentement jusqu'à une certaine valeur, puis s'immobilise. Le zéro de l'appareil est obtenu en retirant complètement l'aiguille.

Les résultats obtenus chez 8 patients (Tableau) donnent des valeurs comprises entre 23,5 et 41,5 mm de mercure, sans qu'il apparaisse de différence significative entre diverses affections rénales et des reins à peu près normaux. C'est le cas en particulier de 2 anuries aiguës

Pression intrarénale chez 8 patients

N°	Age	Diagnostic	Tension artérielle mm de Hg	Azote non protéique mg%	Pression intrarénale mm de Hg
1	55	Néphroangiosclérose discrète	170/ 95	25	32
2	33	Pyélonéphrite chronique discrète	125/ 85	31	24
3	14	Glomérulonéphrite subaiguë	130/ 80	25	34,5
4	20	Glomérulonéphrite chronique	150/ 80	49	36
5	18	Glomérulonéphrite chronique	170/120	156	41,5
6	24	Anurie posttransfusionnelle	150/110	104	31
7	31	Anurie post partum	170/ 95	252	30
8	43	Pyélonéphrite hématogène chronique	135/ 95	304	23,5 * 24,5**

* Avant décapsulation

** Après décapsulation

et d'1 pyélonéphrite hématogène chronique («néphrite interstitielle chronique»); chez ce dernier malade, les mesures ont été faites directement au cours d'une intervention chirurgicale. La p.i.r. n'est pas influencée par la décapsulation.

D'autre part, lorsqu'on compare les p.i.r. de nos 8 malades avec leur tension artérielle moyenne, une corrélation positive semble apparaître pour tout le groupe (Fig.). La pente de la droite construite par la méthode des plus petits carrés à partir de ces observations est donnée par l'équation

$$\text{p.i.r.} = 0{,}19 \text{ tens. art. moy.} + 9{,}0.$$

Rappelons que chez le chien, Swann[6] a obtenu une relation très voisine:

$$\text{p.i.r.} = 0{,}22 \text{ tens. art. moy.} + 9{,}4.$$

Ces constatations suggèrent que la p.i.r. chez l'homme dépend dans une certaine mesure de la tension artérielle et que son rôle en pathologie rénale n'a pas l'importance que certains auteurs lui ont attribuée. Si la décapsulation peut avoir un effet favorable, cet effet ne résulte vraisemblablement pas d'une décompression du parenchyme rénal.

F. Reubi

Policlinique de Médecine de l'Université de Berne, le 8 septembre 1955.

Summary

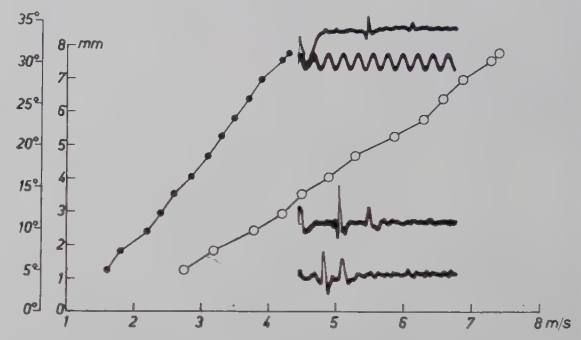
The intrarenal pressure has been determined in man using a needle of the lumbal puncture type connected with a mercury manometer. Preliminary results in 8 patients with various renal diseases indicate no significant difference between cases of glomerulonephritis, acute anuria, chronic pyelonephritis and normal or almost normal kidneys. Our values are comprised between 23·5 and 41·5 mm of mercury, with an average of 34 mm. A possible correlation with the mean blood pressure is suggested by our data: intrarenal pressure = 0·19 mean blood pressure + 9·0. In one case, renal decapsulation had no influence on the intrarenal pressure.

[6] E. G. Swann *et al.*, J. exper. Med. *92*, 625 (1950); Amer. J. Physiol. *168*, 637 (1952).

Geschwindigkeit der Nervenleitung innerhalb der Netzhaut

Während die Nervenleitungsgeschwindigkeit im retrobulbären Teil des *Nervus opticus* bereits mehrfach bestimmt worden ist, ist der Umfang der bedingten Verzögerung, welche die Nervenleitung innerhalb der Netzhaut durch den Verlust der Markscheiden erfährt, bisher unbekannt. Die beträchtliche Verlängerung der Latenzzeiten antidromer Erregungen nach Verschiebung der Mikroelektrode in die Netzhautperipherie bei elektrischer Reizung[1] gibt Veranlassung, die intraretinale Nervenleitungsgeschwindigkeit mit Hilfe der antidromen Methode genauer zu messen.

Die Versuche wurden an Katzen mittels eines geeichten Mikromanipulators und einer Mikroelektrode vorgenommen. Die Elektrode wurde nach Entfernung von Hornhaut und Linse unter Kontrolle des Auges auf die *Papilla nervi optici* vorgeschoben und die Lage der Elektrode im blinden Fleck mittels elektrischer Reizung als Ableitungsstelle mit kürzester Latenzzeit am Oszillographen kontrolliert. Sodann wurden unter stufenweiser radiärer Verschiebung des Mikromanipulators Ableitungspunkte in der Netzhautperipherie aufgesucht und die erhaltenen Potentiale oszillographiert. Die Verspätungen der an den einzelnen Stellen abgeleiteten Aktionspotentiale wurden, wie die Abbildung zeigt, der Berechnung der Leitungsgeschwindigkeit zugrunde gelegt. Bei der Berechnung des Abstandes der Ableitungspunkte vom blinden Fleck wurde eine angenommene sphärische Form des Bulbus berücksichtigt, wozu nach Versuchsende jeweils der Krümmungsradius des anderen uneröffneten Auges bestimmt wurde.



Leitungsgeschwindigkeiten für Gruppe I- und Gruppe II-Opticusfasern innerhalb der Netzhaut. Das Diagramm zeigt das Anwachsen der Latenzzeiten der Aktionspotentiale bei Verschiebung der ableitenden Mikroelektrode, ausgehend von einer Stelle 1,25 mm unterhalb des blinden Flecks und radial fortschreitend im unteren nasalen Quadranten der Netzhaut. Reizelektrode im kontralateralen *Corpus geniculatum laterale*. Die beiden Kurven entsprechen Leitungsgeschwindigkeiten von 2,4 m/s (gefüllte Kreise) und 1,4 m/s (offene Kreise) für Gruppe I- bzw. Gruppe II-Sehnervenfasern. Die als zweite Ordinate aufgetragenen Winkelgrade sind die entsprechenden Gesichtsfelddimensionen bei nichtgeöffnetem Auge. Die eingefügten Oszillogramme entsprechen den Ableitungspunkten (von unten nach oben) 1,25, 3,5 und 7,75 mm nasal-peripher vom blinden Fleck. Man sieht nach dem Reizeinbruch das frühe grössere Potential der Gruppe I-Fasern und das spätere kleine Potential der Gruppe II-Fasern. Zeitmarken in m/s.

Die auf diese Weise gemessenen mittleren Leitungsgeschwindigkeiten betragen 2,86 ± 0,66 m/s für Gruppe I-Opticusfasern und 1,7 ± 0,32 m/s für Gruppe II-Fasern, die entsprechenden maximalen Leitungsgeschwindigkeiten 3,6 m/s bzw. 1,9 m/s. Dabei zeigt die Nervenleitung in den verschiedenen Quadranten der Netzhaut keine erkennbaren Unterschiede. Die Grössenausdehnung des bei Reizung des homolateralen und kontralateralen *Tractus opticus* beidseitig innervierten Bezirkes um den blinden Fleck beträgt etwa 1,5 mm.

Eine Gegenüberstellung der maximalen Leitungsgeschwindigkeiten im retrobulbären Teil des *N. opticus*[2] für die Gruppe I- bzw. II-Opticusfasern von 70 bzw. 23 m/s mit den von uns gefundenen Werten zeigt, dass die Geschwindigkeit der Sehnervenleitung innerhalb der Netzhaut eine für die Gruppe I-Fasern um etwa 20mal und für die Gruppe II-Fasern um etwa 12mal langsamere ist als nach Verlassen der Netzhaut.

Da diese Versuche lediglich Ergebnisse antidromer elektrischer Reizungen darstellen, sind über die Bedeutung der verzögerten Nervenleitung innerhalb der Netz-

[1] R. Granit, *Centrifugal and antidromic effects on ganglion cells of retina*, J. Neurophysiol. *18*, 388 (1955).

[2] P. O. Bishop, D. Jeremy und J. W. Lance, J. Physiol. *121*, 415 (1953).

haut erst nach Versuchen mit Lichtreizen weitere Aussagen möglich. Immerhin ist schon jetzt zu vermuten, dass die verzögerte Leitungsgeschwindigkeit in der Netzhaut – wenigstens beim bewegten Auge – als ein zusätzlicher Mechanismus zu einer Umformung von Zeit- in Raumkoordinaten benutzt wird.

E. Dodt

Nobel-Institut für Neurophysiologie, Stockholm 60, den 29. September 1955.

Summary

The conduction velocity of the unmyelinated portion of the optic nerve fibres within the cat's retina was measured by shifting a microelectrode from the blind spot outwards and stimulating antidromically in the lateral geniculate body. The mean conduction velocities were 2·8 m/s for the fast, and 1·7 m/s for the slow group of optic nerve fibres, as compared with maxima of 70 and 23 m/s respectively for the same groups in the myelinated extrabulbar portion.

Crossed Fastigial Atonia[1]

The present experiments were concerned with the influence of localized lesions of the *Nucleus fastigii* on the extensor rigidity of the decerebrate cat. The transection of the brain stem was made just frontally to the anterior *Colliculi* («precollicular» cats), but preparations decerebrated at ponto-midbrain levels («postcollicular» cats) were also used. The cerebellar lesions were made electrolytically, after decerebration, through electrodes orientated with a Horsley-Clarke stereotaxic apparatus. 60 cats were studied while lying prone in a hammock, with the head held symmetrically in the Horsley-Clarke machine and with the limbs hanging free.

(1) Decerebrate rigidity was increased ipsilaterally and abolished or strongly decreased contralaterally after a lesion confined to the caudal pole of one fastigial nucleus. Serial Nissl and Weil slides showed that the other cerebellar nuclei and all brain stem structures were normal. The abolition of extensor rigidity in the contralateral limbs will be henceforth referred to as "crossed fastigial atonia".

(2) Crossed fastigial atonia is a deficiency symptom, since (*a*) it was observed up to 24 h after the lesion in the decerebrate preparation; (*b*) a marked reduction of postural extensor tonus follows chronic lesion of caudal pole of contralateral fastigial nucleus in the otherwise normal cat (Batini and Pompeiano[2]); and (*c*) electrical stimulation (300/s, 1 ms, 0·3 – 0·5 volts) of fastigial points, whose destruction is followed by crossed atonia, yielded the opposite postural asymmetry (i.e. ipsilateral flexion and crossed extension).

(3) Crossed fastigial atonia was observed after (*a*) postcollicular decerebration; (*b*) anterior lobe topectomy; (*c*) postbrachial transection of spinal cord, i.e. when decerebrate rigidity became very marked following different types of release from tonic inhibition. It was immediately and permanently abolished, and postural asymmetry was replaced by bilateral rigidity, when the caudal pole of the contralateral fastigial nucleus was destroyed. Apparently crossed fastigial facilitation is required for overcoming some inhibitory influence, and the postural imbalance is abolished as soon as symmetrical lesions are performed. Experiments aimed at identifying the inhibitory mechanisms underlying crossed fastigial atonia are in progress.

(4) The reverse postural asymmetry, characterized by ipsilateral disappearence or strong decrease of decerebrate rigidity, with increase of extensor hypertonus in contralateral limbs, occurred whenever the foremost $^1/_2$ or $^2/_3$ of fastigial nucleus was destroyed unilaterally. Since this operation involves unilateral severance of Russell's hook bundle after interfastigial crossing, as well as destruction of direct fastigio-bulbar systems, the origin of ipsilateral fastigial atonia must be left for further investigation. Similar mechanisms may underly Sprague and Chambers' phenomenon[3], which is characterized by ipsilateral flexor hypertonus and marked contralateral extensor rigidity following total destruction of one fastigial nucleus. We have confirmed these observations after total ablation of one fastigial nucleus and we found occasionally that slight flexor hypertonus paralleled disappearence of extensor rigidity even after partial lesions. Active flexion was not observed, however, following postcollicular decerebration and its midbrain mechanisms will be investigated with further experiments. In the present note we are concerned merely with unilateral abolition of extensor rigidity.

(5) Unilateral aspiration, cooling or local nembutalization (6%) of *Pyramis* and *Uvula* (Larsell's lobules[4] VIII and IX) were followed by a postural asymmetry similar in sign, but slighter in degree, to that elicited by a lesion of the underlying caudal pole of the *Nucleus fastigii*. This postural asymmetry was replaced by bilateral rigidity if contralateral folia of lobules VIII and IX were removed.

These physiological observations, combined with old and recent anatomical data (see Jansen[5]), suggest (1) that a tonic facilitatory discharge arises in the caudal part of each fastigial nucleus and is relayed to crossed brain stem mechanisms by Russell's hook bundle and (2) that the caudo-fastigial discharge is at least partially driven by corticonuclear volleys arising in the ipsilateral part of Larsell's lobules[2] VIII and IX.

G. Moruzzi and O. Pompeiano

Institutes of Physiology, Universities of Pisa and Bologna, Italy, September 24, 1955.

Riassunto

La distruzione unilaterale del polo caudale del nucleo del tetto del cervelletto nel gatto decerebrato è seguita da scomparsa o intensa riduzione della rigidità estensoria negli arti contralaterali. Diversi esperimenti suggeriscono che il fascio uncinato di Russell trasmette un'influenza tonica facilitatrice esercitata da neuroni fastigiali sui meccanismi estensori del lato opposto.

[1] This work was supported by a grant of the Consiglio Nazionale delle Ricerche.

[2] C. Batini and O. Pompeiano, Boll. Soc. it. Biol. sper. (in press).

[3] J. M. Sprague and W. W. Chambers, J. Neurophysiol. *16*, 451 (1953).

[4] O. Larsell, J. comp. Neurol. *99*, 135 (1953).

[5] J. Jansen, *Efferent cerebellar connections*, in: J. Jansen and A. Brodal, *Aspects of cerebellar anatomy* (J. Grundt Tanum, Oslo, 1954).

Spielen die Eigenreflexe bei raschen Willkürkontraktionen eine entscheidende Rolle?

Bekanntlich kann man beim gesunden und ruhenden Menschen durch einen leichten Schlag auf die Fußsohle, also eine Dehnung des *Musculus gastrocnemius*, einen Eigenreflex auslösen; seine Latenzzeit liegt zwischen 30 und 34 ms (Abb. 1*a*). Willkürliche Dauerinnervation steigert die Eigenreflexe beträchtlich (Hoffmann[1]), und es lässt sich darüber hinaus zeigen, dass durch Vibration die sonst asynchronen Motoneuron-Entladungen der Willkürinnervation in eine Reflexreihe, in völlig synchrone Impulse aufgelöst werden können (Preisendörfer[2]).

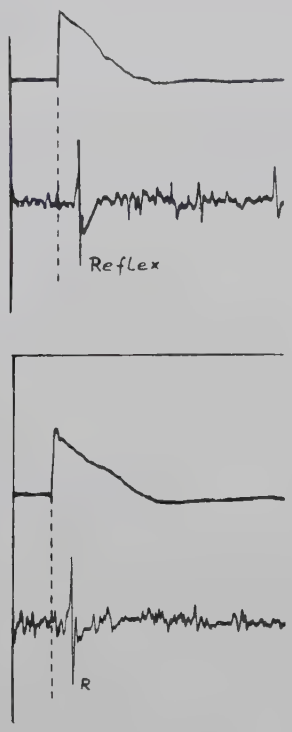


Abb. 1*a*. Adäquate Auslösung eines monosynaptischen Reflexes (*R*) im Gastrocnemius des Menschen bei kurzem Schlag auf die Fußsohle. Die gestrichelte Linie gibt den Zeitpunkt der Reflexauslösung wieder.

Dieser sicherlich evidente Zusammenhang willkürlicher und reflektorischer Innervation veranlasste Hoffmann[3] zu der Feststellung, «dass die Verteilung der Salven von Erregungen, die aus dem Rückenmark gesandt werden, in hohem Masse den monosynaptischen Reflexen überlassen wird». – Nicht nur diesem Gedankengang, sondern auch der allgemeinen Ansicht folgend, dass der Eigenreflex bei jeder Gelegenheit in die Willkürinnervation eingreife, müsste man *a priori* ein konstantes Auftreten desselben fordern, sofern nur immer der adäquate Reiz, die Dehnung des entsprechenden Muskels ins Spiel kommt. Es überrascht daher nicht wenig, wenn man ihn im Verlaufe einer raschen Willkürkontraktion zum erwarteten Zeitpunkt, das heisst 30–34 ms nach erfolgter Dehnung des zuvor willkürlich kontrahierten Muskels, überhaupt nicht findet. Abbildung 1*b* zeigt das Elektromyogramm des Gastrocnemius beim plötzlichen Abstossen des Fusses vom Boden. Die nach unten gerichtete Deflektion der oben laufenden Grundlinie markiert das Verlassen der Fußsohle vom Boden, die nachfolgende Deflektion nach oben bezeichnet den Beginn des Auftretens der Fußsohle auf den Boden, also den Beginn der Gastrocnemius-Dehnung. (Es handelt sich nicht um das Mechanogramm des Gastrocnemius, sondern nur um die Kontaktmomente der Fußsohle mit dem Boden.)

Die Aktionsstromfolge einer raschen Willkürkontraktion ist in einer früheren Arbeit bereits ausführlich diskutiert worden (Hufschmidt[4]). Hier interessiert allein, dass, während die Fußsohle noch in der Luft schwebt, im Gastrocnemius der «rebound» erscheint, und dass weiterhin 30 ms nach dem Dehnungsbeginn – dieser

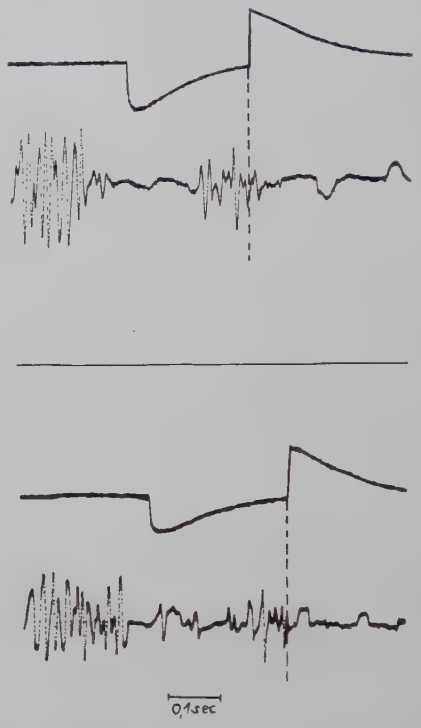


Abb. 1*b*. Einmaliges kurzes Abstossen des Körpers vom Boden. Die untere Ableitung gibt das Elektromyogramm des *M. Gastrocnemius* beim Menschen wieder. Die gestrichelte Linie bezeichnet den Zeitpunkt, da der Fuss wieder auf den Boden trifft.

ist durch die gestrichelte Linie in Abbildung 1*b* fixiert – die elektrische Grundlinie wieder ruhig, die Innervation praktisch erloschen und ein Eigenreflex erst recht nicht zu finden ist. Ein solches Verhalten ist keineswegs einmalig oder zufällig, wie Abbildung 2 eindeutig beweist: Bei schnellem Hüpfen verlagern sich die Aktionsstromgruppen zeitlich genau zwischen das Hochschnellen und Wiederauftreten, und von dem Augenblicke an, wo zum erstenmal ein Eigenreflex auftreten könnte, ja geradezu erwartet wird – gestrichelte Linie in der Abbildung 2 –, herrscht völlige Innervationsstille[5].

Die frappante Diskrepanz zwischen mechanischer Fussbewegung und zugehörigem Aktionsstrom löst sich

[1] P. Hoffmann, Z. Biol. *68*, 351 (1918).
[2] F. Preisendörfer, Z. Biol. *70*, 505 (1919).
[3] P. Hoffmann, Exper. *8*, 357 (1952).
[4] H.-J. Hufschmidt, Z. Biol. *107*, 1 (1954).
[5] Bei der mechanisch-elektrophysiologischen Untersuchung des Klonus stiessen Wachholder und Altenburger [Dtsch. Z. Nervenheilkde. *84*, 117 (1924)] auf das gleiche Phänomen und postulierten hiefür einen zentralen Rhythmus pathologischer Genese. Wie man sieht, lässt sich das gleiche beim Menschen mit normaler Motorik nachweisen, und man wird ein willkürliches Hüpfen nicht einem zentralen autonomen Rhythmus gleichsetzen wollen.

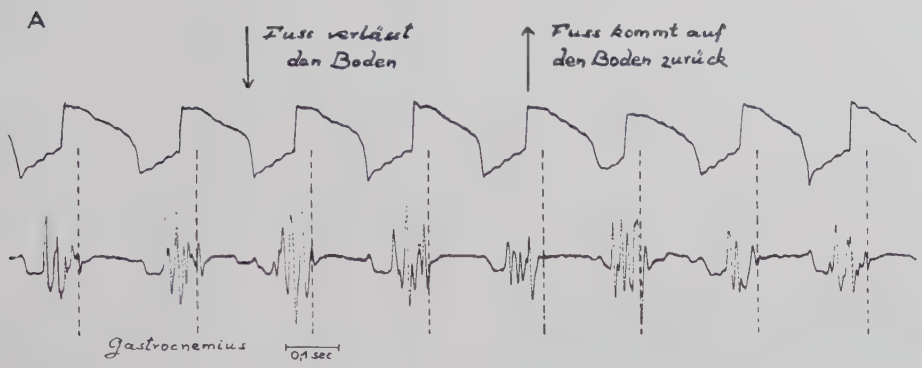


Abb. 2. Elektromyogramm des Gastrocnemius beim Menschen: schnelles willkürliches Hüpfen. Hier bezeichnet die gestrichelte Linie den Zeitpunkt, zu welchem ein Dehnungsreflex (monosynaptisch) erwartet wird. Die Deflektionen der oberen Grundlinie markieren in allen Abbildungen die Momente, in denen der Fuss sich vom Boden löst (Deflektion nach unten) oder auf den Boden zurückkommt (Deflektion nach oben).

durch folgenden Befund: Vom Beginn des Aktionsstromes bis zum Start der mechanischen Bewegung liegt eine beachtliche, individuell verschieden lange Latenz. Sie ist bei rascher Rhythmik von der gleichen Grössenordnung wie die Zeitspanne zwischen Innervationsbeginn und Wiederauftreten des Fusses. Somit fällt der durch die jeweilige Innervation hervorgerufene mechanische Effekt mit dem Momente der Dehnung zusammen!

In einer solchen Kette rascher, rhythmischer Willkürbewegungen, wie dieser hier während des Hüpfens, steckt in jedem Innervationsstoss bereits der «rebound» der vorhergehenden Entladung, welcher auf die geschilderte Weise die eigentliche Aufgabe des Eigenreflexes, das Abbremsen des Aufschlages nämlich, vorwegnimmt. Und zwar zeitlich präziser, weil er im entscheidenden Moment wirklich da ist und nicht noch, wie der Reflex, eine beträchtliche Zeit erfordert. Zu bedenken, wenn auch an dieser Stelle nicht weiter auszuführen wäre noch, dass sehr wohl monosynaptische Reflexe im Verlaufe der Innervation selbst, als sogenannte «Anspannungsreflexe» (Hoffmann[6]) auftreten können und dass die rhythmischen Hemmungsphasen zu einem guten Teil der autogenen Muskelhemmung (Granit[7]) zugeschrieben werden müssen (Hufschmidt[8]). Warum nun der Eigenreflex trotz adäquatem Reiz im Verlaufe der raschen Willkürkontraktion *nicht* auftritt, ähnlich wie auch der «Entlastungsreflex» unter gleichen Bedingungen (Sommer[9]), bleibe vorläufig dahingestellt.

H.-J. Hufschmidt

Neurologische Universitätsklinik Würzburg, Luitpold-Krankenhaus, den 11. Oktober 1955.

Summary

A short time after a quick voluntary movement, there is no evidence of a monosynaptic reflex (Eigenreflex) following a stretch of the same muscle. Thus rhythms of voluntary movements may exist without interaction of stretch reflexes.

[6] P. Hoffmann, Nervenarzt *24*, 19 (1953). – Hierher gehört auch die initiale Bahnung der Motoneurone im Verlaufe einer Muskelkontraktion [R. Granit, J. Neurophysiol. *13*, 351 (1950)].
[7] R. Granit, J. EEG clin. Neurophysiol. *2*, 417 (1950).
[8] H.-J. Hufschmidt, Pflügers Arch. *260*, 210 (1955).
[9] J. Sommer, Dtsch. Z. Nervenheilkde. *150*, 83 (1939).

PRO LABORATORIO

An Attachment for the Measurement of the Absorption Spectra on Paper Chromatograms

Searching for a general method for the detection and quantitative determination of glycyrrhizinic acid and other substances in licorice root and licorice extract, the ascending paper strip chromatography as described by Gootjes and Nauta[1] was applied. The prescribed colour reaction with Rhodamin B in 1 N sulfuric acid is, however, specific for glycyrrhizinic acid only, so that other compounds present cannot be detected.

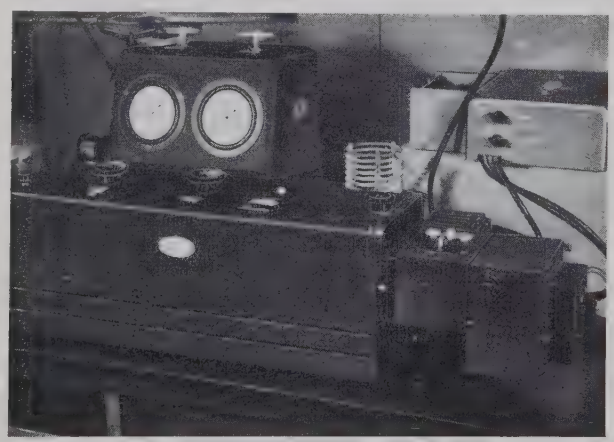


Fig. 1.–Attachment assembled.

An attachment to the Model DU-Beckman Quartz Spectrophotometer was, therefore, developed which permits the scanning of the paper chromatogram, the determination of the Rf-values of its components by the method of Tennent and co-workers[2], and the measurement of the absorption spectra of the individual substances forming spots. It makes unnecessary the elution of the spots and even colour reactions in those cases, in which the substance has a characteristic absorption spectrum.

[1] J. Gootjes and W. Th. Nauta, Rec. Trav. chim. *73*, 886 (1954).
[2] D. M. Tennent, J. B. Whitla, and K. Florey, Anal. Chem. *23*, 1748 (1951).

Apparatus and Method. The apparatus consists of a rectangular brass box (140 mm length, 95 mm height and 95 mm width) which is inserted instead of the usual absorption cell compartment between the photo-tube housing and the monochromator of the DU-Beckman Quartz Spectrophotometer (Figure 1). This box has openings on both sides in the light path of the spectrophotometer and a circular opening (69 mm diameter) on its top, to accomomdate a paper-strip holder (Figure 2).

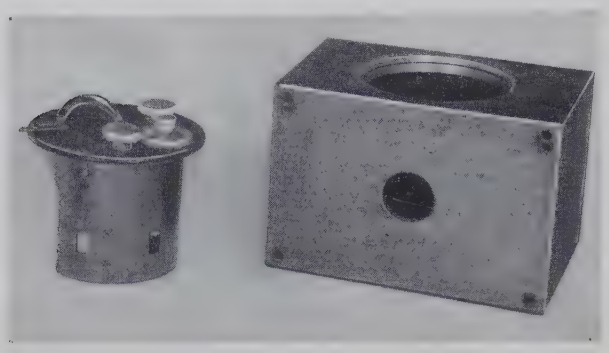


Fig. 2.–Attachment disassembled.

The paper-strip holder consists of a top-covered brass tube of which one half has been cut away, containing two split shaft spindles, a third indicator spindle to which a rubber disc is attached, and a guiding metal frame. The paper strip (17 mm width) is wound on the split shaft spindles. When moving, it passes between a window (9 × 7 mm) and the metal frame, rotating the rubber disc of the indicator spindle which measures the distances travelled by the paper strip with the help of a calibrated metal disc and a pointer. The calibrated metal disc is divided into 50 sectors, each one equivalent to 1 mm distance. A second framed window of exactly identical dimensions and a metal clip for the blank paper are

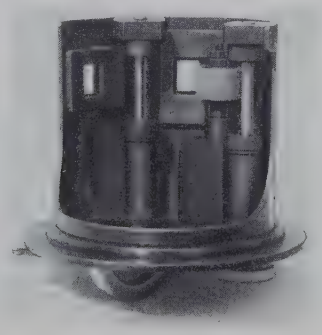


Fig. 3.–Paper-strip holder.

located in some distance from the sample window. By rotating the paper-strip holder in the circular opening of the above-mentioned box, these two windows can be brought into the light path successively, both of them being located next to the photo-tube housing. All parts of the attachment are blackened, so as to avoid the reflection of light (Fig. 3 and 4).

The measurement is carried out as follows: after compensating the dark current, the blank window is brought into the light path, the wave length dial adjusted and the selector switch is set on "check". The photo-tube shutter is opened, and the apparatus compensated by means of the slit width and sensitivity knobs; then the shutter is closed again. The selector switch now is set on the 0·1 position, the sample window is brought into the light path by rotating the paper-strip holder in its box, the shutter is opened and the galvanometer compensated by turning the Density knob. The absorbance read is recorded.

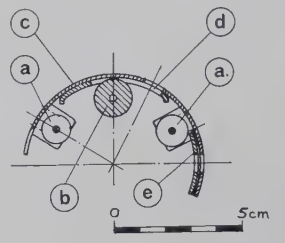


Fig. 4.–Horizontal cross-section of the Paper-Strip Holder. *a* Split shaft spindles. *b* Rubber disc of the indicator spindle. *c* Tube wall. *d* Sample window with metal guiding frame. *e* Blank window with metal guiding frame.

The scanning is carried out at several wave lengths in succession. The dark current is balanced, the wave length dial adjusted, the Density knob set at zero (100 % transmittance), and the selector switch set at 0·1 position. Then the shutter is opened, and the instrument balanced by adjusting the slit width and the sensitivity. One scans by opening the shutter and balancing with the Density knob without changing the slit width or the sensitivity. Measurements are made every 5 mm.

For the determination of Rf-values, scanning is carried out as described, but at the wave length of the absorption maximum of the particular substance.

In case the chromatogram proves to be too dense, its transmission can be increased by immersing the paper strip in paraffin oil which, of course, has to be transparent at the wave length used.

A detailed description will be published elsewhere.

The author is indebted to Mr. Joel Rawicz for the construction of the instrument. This investigation has been carried out under the auspices of the Scientific Department, Israel Ministry of Defence.

Ch. Eger

Scientific Department, Ministry of Defence, Tel-Aviv, Israel, August 20, 1955.

Zusammenfassung

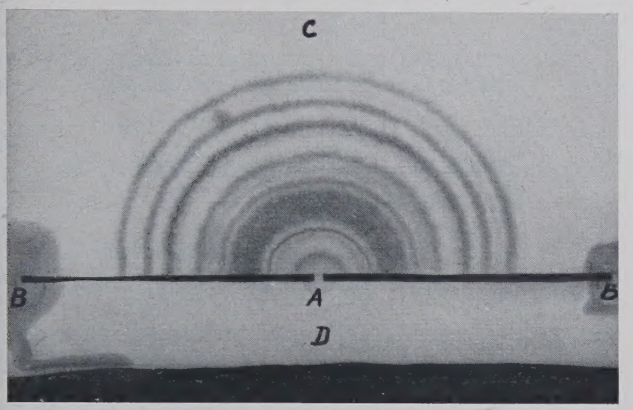
Mit der Hilfe eines neuen Zusatzinstruments zum Beckman-Quarz-Spektrophotometer ist es möglich, die Absorptionsspektra isolierter Substanzen auf Papierchromatogrammen zu messen. Ferner erlaubt das Instrument die Bestimmung der Rf-Werte nach der Methode von Tennent und Mitarbeitern.

PRO EXPERIMENTIS

Use of Large Filter Paper Sheet in Circular Paper Chromatography by Descending Technique

The use of a large size of filter paper is found to give better resolution of substances in circular paper

chromatography[1]. Filter paper circles of 35 cm diameter are always found to give better defined separation of substances than filter paper circles of 18 cm diameter. But irrigation of large diameter filter paper requires a special type of apparatus[2] which again is sometimes difficult to procure. In the present communication a method is described in which large filter paper sheets can be irrigated in the usual chromatographic chambers used for two-dimensional purpose by the descending technique.



Whatman No. 1 filter paper sheet (50 × 32 cm) was used for the purpose. Two parallel straight lines are drawn, 5 mm apart at a distance of 7 cm from the shorter portion of the paper sheet. Now, in order to give the solvent a radial flow, two long slits are made along these parallel lines leaving a small 5 mm width portion *A* (Figure) at the centre of the long parallel lines and 3 cm width *B* (Figure) portions at the ends of these parallel lines. The central 5 mm portion *A* will now act as the passage of solvent flow from the solvent reservoir to the main sheet. The end portions *B* are not cut out in order to give the paper sheet an additional support. In order to restrict the passage of the solvent flow from supply source *D* (Figure) through the central connecting paper passage *A*, the portions *B* which also connect the main paper *C* with solvent supply source are sealed up with paraffin wax as shown in the Figure. Naturally, the solvent will now flow through the constriction *A* and spread radially throughout the main paper sheet. The substance to be chromatographed is spotted at the position *A* and the whole paper then carefully fitted in a glass trough and placed in a chromatographic chamber for saturation of the paper with the particular solvent, as is done in descending type of chromatography. About 50 μl containing 30–40 μg of individual amino acids can be chromatographed. After a saturation period of 24 h, the solvent (*n*-Butanol:acetic acid:water = 4:1:1) is poured into the trough in the chamber and the paper is developed in the descending way as usual. The solvent, after passing through the passage *A*, takes a period of 24 h to travel a radial distance of 25 cm.

Using this method, it is very convenient to develope paper of a larger size (57·5 × 47 cm) radially to avoid the special type of apparatus. The paper sheet serves the purpose of a paper circle of double size. The separation achieved by this method is quite satisfactory, as can be seen from the accompanying photograph (Figure) of a chromatogram of a protein hydrolysate developed with *n*-Butanol:acetic acid:water (4:1:1). The method is successfully applied in quantitative estimation of amino acids.

Thanks are due to Dr. S. C. Roy, Department of Applied Chemistry, Calcutta University, for his kind interest in the work.

N. C. Ganguli

Department of Applied Chemistry, University College of Science and Technology, Calcutta-9, India, August 20, 1955.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode für die Anwendung grosser Papierbogen bei Kreispapierchromatographie beschrieben. Eine Chromatographiekammer für absteigende Technik wird verwendet. Durch einen in der Mitte unterbrochenen Schlitz parallel zum Papierrand und durch Paraffinimprägnierung der seitlichen, nicht durchtrennten Ränder wird der Radiärfluss des Lösungsmittels erreicht. Die Trennung der Aminosäuren eines Proteinhydrolysats gelingt so besser als bei Verwendung kleiner Filterpapiere.

[1] K. V. Giri, Nature *171*, 1159 (1953).
[2] K. V. Giri and N. A. N. Rao, J. Ind. Inst. Sci. *34*, 95 (1952).

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Sample Survey Methods and Theory

By M. H. Hansen, W. N. Hurwitz, and W. G. Madow

Vol. I: *Methods and Applications*, 638 p.
Vol. II: *Theory*, 332 p.
(John Wiley & Sons, New York, 1953)

Nicht nur in den Wirtschaftswissenschaften, dem klassischen Anwendungsgebiet der «Statistik», sondern auch weit darüber hinaus haben sich in den letzten Jahrzehnten neben den vollständigen Erhebungen und Zählungen die Stichprobenerhebungen in zunehmendem Masse durchzusetzen vermocht. Den Grund hierfür darf man wohl darin sehen, dass Stichprobenerhebungen rascher und billiger, und in vielen Fällen auch zuverlässiger, die gewünschte Information über die Struktur oder über typische Eigenschaften einer Gesamtheit von Dingen oder Individuen zu vermitteln vermögen, als dies umfassende Erhebungen zu tun in der Lage sind.

In den beiden Bänden geben die Verfasser, die an der Entwicklung der neuen Stichprobenverfahren selber

massgebend beteiligt sind, eine gründliche und erschöpfende Darstellung aller Aspekte der modernen Stichprobentechnik. Diese basiert auf der zufälligen Auslese der Stichprobeneinheiten und damit auf der Anwendung wahrscheinlichkeitstheoretischer Prinzipien, die allein zuverlässige Schätzungen und die Ermittlung des Stichprobenfehlers aus der Stichprobe selbst erlauben. Auf diese Weise können auch verschiedene Stichprobenpläne, die zur Beschaffung der gewünschten Information eventuell noch zur Wahl stehen, miteinander verglichen und derjenige mit dem grössten Wirkungsgrad ausgelesen werden. Neben einer Darstellung der verschiedenen Arten von Stichprobenplänen sowie der Hilfsmittel zur Reduktion des Stichprobenfehlers, wie Schichtung und Stufung, bieten die Verfasser einen Exkurs über systematische Stichproben und über Zeitreihen.

Durch die Zweiteilung des Stoffes in einen methodischen und einen mathematischen Teil gelingt es den Verfassern, einerseits im ersten Band die praktische Seite ohne Unterbrechungen durch mathematische Beweisführungen übersichtlich und klar darzustellen und sie damit dem Verständnis auch des mathematisch weniger Bewanderten nahezubringen, wobei die Einheit von Planung, Durchführung und Auswertung der Erhebung betont wird, während anderseits durch Zusammenstellung der wahrscheinlichkeitstheoretischen Grundlagen im zweiten Teil die Geschlossenheit der Theorie deutlich hervortritt. Beide Teile sind aufs beste miteinander koordiniert, überdies erleichtern ausführliche Sachregister in beiden Teilen das Sichzurechtfinden. Eingestreute Übungen und zahlreiche Literaturhinweise am Ende jedes Kapitels erhöhen den Wert des auch sonst vorzüglich ausgestatteten Werkes, das sich in der Hand eines jeden, der sich mit Stichproben zu befassen hat, bald als unentbehrlich erweisen wird und nicht verfehlen wird, zur Förderung der Stichprobenverfahren in theoretischer Beziehung wesentlich beizutragen.

A. Linder

The Mechanism of Enzyme Action

A symposium sponsored by McCollum-Pratt Institute of the Johns Hopkins University

By W. D. McElroy and B. Glass

(The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954)
(819 pages. 11 $)

In der interessanten Bücherreihe, welche die bekannten biochemischen Symposia des McCollum-Pratt Institute of the Johns Hopkins University, Baltimore, wiedergibt, liegt nun als vierter Band das «Symposium über den Enzymmechanismus» vor. Die enorme Entfaltung der Enzymforschung während der letzten dreissig Jahre hat in erster Linie die Identifizierung, Reinigung und Reindarstellung von zahlreichen Fermenten gebracht. Erst dadurch ist der Weg zur Erforschung der Reaktionsmechanismen vieler biochemischer Reaktionen geebnet worden. Gerade mit diesen Problemen befasste sich das Symposium unter Teilnahme von Physikochemikern, organischen Chemikern und reinen Biochemikern. Das Resultat ist eine Reihe von Beiträgen, die in fesselnder Weise einzelne Themen behandeln und gleichzeitig den Gedankenaustausch in den Diskussionen widerspiegeln.

Die Hauptthemen sind: 1. Protein-Konfiguration und biologische Aktivität. 2. Kinetik der Enzym-katalysierten Reaktionen. 3. Funktion der Metalle in der Enzymkatalyse. 4. Mechanismus der Elektronen- und Wasserstoffübertragung. 5. Funktion der Enzyme in der Übertragung von funktionellen Gruppen.

Diese Aufzählung zeigt deutlich, welche interessanten Probleme in diesem Buch zur Sprache kommen. Im übrigen wird jedes Hauptthema in mehreren Beiträgen behandelt, und das Ganze bildet eine faszinierende Lektüre, die jedem Biochemiker aufs beste empfohlen werden kann.

K. Riise-Schäferna

The Enzymes

Chemistry and Mechanism of Action
(A new encyclopedic work in 4 parts)

Edited by J. B. Summer and K. Myrbäck

Vol. IV, part 2. Pages 791–1440
(Academic Press Inc., New York, 1952)
(14 $)

Vor kurzem ist der schon lange erwartete vierte und letzte Band der Enzyklopädie «The Enzymes» erschienen. Zu den schon erschienenen 64 Kapiteln in den ersten drei Bänden sind nun ergänzend noch 14 weitere hinzukommen. Das in der früheren Besprechung Gesagte gilt auch für diesen vierten Band (Exper. *8*, 310 [1952]). Die einzelnen Beiträge zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Geschlossenheit aus, die dem Charakter einer Enzyklopädie gerecht wird und dem Forscher, welcher sich über einzelne ihn interessierende Enzymsysteme orientieren will, einen guten Überblick über den Stand der Forschung auf Ende 1950 vermittelt. Leider hat die Herausgabe des sehr umfangreichen Werkes ziemlich lange gedauert. Einzelne Beiträge sind deshalb etwas veraltet, und wertvolle neue Erkenntnisse, welche gerade in den letzten zwei Jahren mit Hilfe der Isotopentechnik gewonnen wurden, konnten nicht mehr berücksichtigt werden.

Da aber Enzyklopädien in den seltensten Fällen dem Fachmann als Kompendium dienen, sondern den mit diesen Gebieten weniger vertrauten Wissenschaftern ein rasches Einarbeiten ermöglichen sollen, ist dieser Nachteil in Kauf zu nehmen. In diesem Zusammenhang ist die im allgemeinen sehr gute Dokumentation des Besprochenen durch Literaturzitate hervorzuheben, welche ein weiteres, vertieftes Literaturstudium sehr erleichtern.

Mit etwas gemischten Gefühlen liest man das letzte Kapitel «Enzyme Technology». Obwohl diesem ein relativ breiter Raum im letzten Band zugewiesen wurde, müssen sich die Autoren auf eine sehr summarischen Aufzählung der einzelnen technischen Anwendungsgebiete der Enzyme beschränken. Im Interesse der Geschlossenheit des Werkes, welches sich sonst ziemlich konsequent an seine selbstgewählte Aufgabe der Beschreibung der Chemie und des Wirkungsmechanismus der Enzyme hält, wäre dieses technologische Kapitel besser einem ausführlicheren Werk vorbehalten geblieben.

Enzyklopädien zu besprechen, ist für den Referenten meist eine unangenehme Aufgabe, da es sich nicht um geschlossene Werke aus einer Feder handelt, sondern um Beiträge verschiedener Mitarbeiter mit heterogenen Interessen. Dass aber das Werk «The Enzymes» einem grossen Bedürfnis aller mit Enzymen in Berührung kommenden Mediziner, Chemiker und Biologen entgegengekommen ist, zeigt die rege Benützung der ersten drei, schon seit mehr als einem Jahr erschienenen Bände.

A. J. Businger

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

Elektronenmikroskope
Mikrotome
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich

NEUERSCHEINUNGEN AUS DEM BIRKHÄUSER VERLAG

WEYL

Symmetrie

Von Dr. HERMANN WEYL, Professor an der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich und am Institute for Advanced Study in Princeton. Aus dem Englischen übersetzt von Prof. Dr. LULU BECHTOLSHEIM, University of Redlands/Cal. (USA.).
157 Seiten mit 72 Figuren. Preis gebunden Fr. 17.70 (DM 17.70).
Sammlung «Wissenschaft und Kultur» – Band 11.
Inhalt: 1. Bilaterale Symmetrie – 2. Translatorische, rotative und verwandte Symmetrien – 3. Ornamentale Symmetrie – 4. Die allgemeine mathematische Idee der Symmetrie – 5. Zwei Anhänge über endliche Rotationsgruppen in drei Dimensionen.
Wo immer der Mensch Ordnung, Schönheit und Vollkommenheit zu begreifen oder zu schaffen versucht hat, war Symmetrie ihm ein leitendes Prinzip. Dieses mit zahlreichen Abbildungen geschmückte «Handbüchlein der Symmetrie», das in deutscher Übersetzung vier an der Universität Princeton 1951 gehaltene Vorlesungen (Vanuxem Lectures) wiedergibt, sucht auf kleinem Raum allen wesentlichen Seiten dieses faszinierenden Gegenstandes gerecht zu werden.

SPEISER

Die geistige Arbeit

Von Dr. ANDREAS SPEISER, Professor an der Universität Basel. 216 Seiten. Preis gebunden Fr. 19.25 (DM 19.25).
Sammlung «Wissenschaft und Kultur» – Band 9.
Inhalt: Die geistige Arbeit – Die räumliche Deutung der Aussenwelt – Die platonische Lehre vom Unbekannten Gott und die christliche Trinität – Platos Ideenlehre und die Mathematik – Wissenschaft und Glaube – Der Erlösungsbegriff bei Plotin – Die mathematische Betrachtung der Kunst – Die Gottesbeweise von Plato, Anselmus und Leibniz – Die philosophisch-naturwissenschaftliche Fakultät – Geist und Mathematik – Die Grundlagen der Mathematik von Plato bis Fichte – Über die Freiheit – Die mathematische Denkweise in den Geisteswissenschaften und in der Kunst.

WEITZENBÖCK

Der vierdimensionale Raum

Von Prof. Dr. R. W. WEITZENBÖCK, Zelhem, Holland. 216 Seiten mit 52 Figuren. Preis gebunden Fr. 19.55 (DM 19.55).
Sammlung «Wissenschaft und Kultur» – Band 10.
Inhalt: Die Grundlagen – Das Feenreich der Geometer – Raum und Zeit – Der R_4 und andere Wissensgebiete – Der R_4 in der phantastischen Literatur – Literatur.
Es handelt sich um eine Erweiterung und Umarbeitung des 1929 unter demselben Titel erschienenen Werkes. Der Verfasser versteht es in seltener Weise, die wesentlich mathematischen Probleme einem Leser klar zu machen, der nicht mehr als das in der Schule übliche Mass von Kenntnissen besitzt, was nur einem Forscher möglich ist, der wie Weitzenböck in dem zentralen Gebiet der Mathematik lebt.

Bestellungen an Ihren Buchhändler – Orders through your bookseller
Commandes à votre libraire